

Aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**MDCKII–bABCG2–Zellen: ein Modell zur Abschätzung der Anreicherung von
Pflanzenschutzmitteln in der Milch**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Lydia Kuhnert
aus Rochlitz

Leipzig, 2019

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Walter Brehm

Betreuer: Professor Dr. Walther Honscha

Gutachter: Professor Dr. Walther Honscha
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
An den Tierkliniken 15, 04103 Leipzig

Professor Dr. Manfred Kietzmann
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 17, 30559 Hannover

Tag der Verteidigung: 09. April 2019

Allen Widrigkeiten zum Trotz...

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	4
2.1	Überblick über Membrantransporter	4
2.2	ABCG2-Effluxtransporter	5
2.2.1	Überblick	5
2.2.2	Struktur	6
2.2.3	ABCG2-Transportmechanismus.....	8
2.2.4	Spezifität der ABCG2-Substrate und Inhibitoren.....	9
2.2.5	Gewebeexpression	11
2.2.6	Bedeutung	12
2.2.7	Regulation der ABCG2-Transportaktivität.....	14
2.3	Fremdstoffsekretion der bovinen Milchdrüse.....	16
2.3.1	Funktionelle Anatomie	16
2.3.2	Transportmechanismen.....	16
2.3.3	Fremdstofftransporter	17
2.3.4	Bedeutung des ABCG2-Transporters	19
2.4	Pestizide.....	20
2.4.1	Überblick	20
2.4.2	Einsatz von Pflanzenschutzmitteln	21
2.4.3	Rechtliche Regelungen	21
2.4.4	MRL-Wert-Festsetzung von Pestiziden.....	22
2.4.5	Exposition des Verbrauchers	23
2.4.6	Gesundheitliche Risiken	24
2.4.7	Pestizide als endokrine Disruptoren	25
2.4.8	Mehrfachrückstände	26
2.4.9	Risikobewertung von Mehrfachrückständen	27

Inhaltsverzeichnis

2.5	Problemstellung und Zielsetzung	29
3	Material und Methoden.....	30
3.1	Material.....	30
3.1.1	Pestizide.....	30
3.1.2	Chemikalien.....	32
3.1.3	Kit	32
3.1.4	Puffer und Lösungen.....	32
3.1.5	Zellkultur	33
3.1.6	Geräte.....	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	Allgemeine zellbiologische Methoden	35
3.2.1.1	Kultivierung	35
3.2.1.2	Passagieren	35
3.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	35
3.2.1.4	Kryokonservierung.....	36
3.2.2	Bestimmung der Zellvitalität mittels WST-1 Zytotoxizitätstest.....	36
3.2.3	Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Assay	38
3.2.4	Ermittlung von Interaktionen am bABCG2-Transporter.....	38
3.2.4.1	Aussaat und Vorbehandlung	39
3.2.4.2	Durchführung des Hoechst 33342-Assays	40
3.2.5	Detektion von Pestizidwechselwirkungen am bABCG2-Transporter	41
3.3	Statistik	42
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Auswahl der Pestizide und ihrer Konzentrationen	43
4.2	Auswahl der Pestizidkombinationen	46
4.3	Einfluss der Pestizide auf die Zellvitalität	48
4.4	Interaktionen von Pestiziden am bABCG2-Transporter	53
4.5	Pestizidwechselwirkungen am bABCG2-Transporter.....	56

Inhaltsverzeichnis

5	Diskussion.....	60
5.1	Zellmodell.....	60
5.2	Zellvitalitätsstudien in MDCKII-bABCG2-Zellen.....	61
5.3	Pestizide als potentielle bABCG2-Substrate	64
5.4	Wechselwirkungen von Pestiziden am bABCG2-Transporter	75
5.5	Risiken potentieller bABCG2-Substrate	79
6	Zusammenfassung	80
7	Summary	82
8	Literaturverzeichnis	84
9	Anhang.....	106
10	Danksagung	111

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binding Cassette
ABCB1	ATP-Binding Cassette subfamily B1, MDR1, Pgp
ABCG2	ATP-Binding Cassette subfamily G2, BCRP, ABCP, MXR
ABCP	ATP-Binding Cassette Placenta, ABCG2, BCRP, MXR
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor, Arylhydrocarbon-Rezeptor
APVMA	Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, australische Behörde für Pestizide und Veterinärarzneimittel
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adenosintriphosphat
bABCG2	boviner ABCG2
BCA	Bicinchoninsäure
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2, ABCP, MXR
BfR	Bundesministerium für Risikobewertung
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BSA	Bovines Serumalbumin
BSEP	Bile Salt Export Pump, ABCB11
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
C	Cysteinreste
ca.	circa, zirka
CAG	Cumulative Assessment Groups, kumulative Bewertungsgruppen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAR	Constitutive Androstane Receptor, konstitutiver Androstanrezeptor
CH-223191	1-Methyl- <i>N</i> -{2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl)diazen-1-yl]phenyl}-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamid
CHMP	Committee for Human Medicinal Products
CITCO	6-(4-Chlorphenyl)imidazo[2,1- <i>β</i>][1,3]thiazol-5-carbaldehyd- <i>O</i> -(3,4-dichlorbenzyl)oxim
CO ₂	Kohlendioxid
COM	European Commission, Europäische Kommission
CYP	Cytochrom P450

Abkürzungsverzeichnis

CYP1A1	Cytochrom P450 1A1
CYP1A2	Cytochrom P450 1A2
CYP1B1	Cytochrom P450 1B1
CYP2B	Cytochrom P450 2B
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DHEAS	Dehydroepiandrosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRE	Dioxine Responsive Elements, XRE
DVO	Durchführungsverordnung
ECHA	European Chemicals Agency
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
EMA	European Medicine Agency
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FCS	fetales Kälberserum
FTC	Fumitremorgin C
H33342	Hoechst 33342
hABCG2	humaner ABCG2
HCB	Hexachlorbenzol
HIF-1	Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSP 90	Hitzeschockprotein 90
HUGO	Human Genome Organisation
i. d. R.	in der Regel
IC ₅₀	inhibitorische Hemmkonzentration
inkl.	inklusive
ITC	The International Transporter Consortium
Log P	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
MATE	Multidrug And Toxin Extruder
MDCKII	Madin Darby Canine Kidney II

Abkürzungsverzeichnis

MDR1	Multidrug Resistance Protein 1, ABCB1, Pgp
MEM	Minimum Essential Medium
MRL	Maximum Residue Level (Pestizide)
MRP1	Multidrug Resistance-associated Protein 1, ABCC1
MW	Mittelwerte
MXR	Mitoxantrone resistance protein, ABCG2, BCRP, ABCP
n. g.	nicht gelistet
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
NEA	Non-Essential Amino acid, nicht-essentielle Aminosäuren
NOEL	No Observed Effect Level
Nr.	Nummer
NRKP	nationaler Rückstandskontrollplan
o. g.	oben genannt
OATP1A5	Organic Anion Transporting Polypeptide, SLC1A5
OCT	Organic Cation Transporter, organischer Kationentransporter
OCT1	Organic Cation Transporter 1, SLC22A1
OCTN	Organic Cation Transporter Novel, neuer organischer Kationentransporter
OCTN1	Organic Cation Transporter Novel 1, SLC22A4
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
p,p'-DDD	Dichlordiphenyldichlorethan
p,p'-DDE	Dichlordiphenyldichlorethen
PAN	Pestizid Aktions-Netzwerk e.V.
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Pgp	P-Glykoprotein, ABCB1, MDR1
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
PPR	EFSA Panel on Plant Production Products and their Residues
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
RFU	Relative Fluorescence Units
RL	Richtlinie
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

s.	siehe
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of Mean, Standardfehler
SLC	Solute Carrier
SLC1A5	Solute Carrier family 1 member 5, OATP1A5
SLC22A1	Solute Carrier family 22 member 1, OCT1
SLC22A4	Solute Carrier family 22 member 4, OCTN1
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dichlorpyridyloxy)]benzen
TMD	Transmembrandomäne
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UGT1A	UDP-Glucuronosyltransferase 1A
v. a.	vor allem
VO	Verordnung
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
WST-1	Water Soluble Tetrazolium, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
XAP2	hepatitis B virus protein X-Associated Protein 2
XRE	Xenobiotic Responsive Elements, DRE
z. B.	zum Beispiel
Z/ml	Zellen pro Milliliter

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über Kernrezeptoren, ihre klassischen Liganden und ausgewählte Zielgene (MACKOWIAK und WANG 2016).....	15
Tabelle 2	Pestizide.....	31
Tabelle 3	Übersicht über die Auswahl der Pestizide und der jeweilig eingesetzten Konzentrationen.....	45
Tabelle 4	Übersicht über die ausgewählten Pestizidkombinationen	47
Tabelle A 1	Übersicht über die Anzahl der Milchproben, die in den letzten 5 Jahren (2012 – 2016) im Nationalen Rückstandskontrollplan (NRKP) auf die ausgewählten Pestizide untersucht wurden	106
Tabelle A 2	Übersicht über die Anzahl der Proben von Milch und Milchprodukten, die in den letzten 5 Jahren (2012 – 2016) im Warenkorb-Monitoring auf die ausgewählten Pestizide untersucht wurden.....	107
Tabelle A 3	Übersicht über Verteilungskoeffizienten der ausgewählten Pestizide (KIM et al. 2016)	108

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Struktur der Subfamilien A – G der ABC-Transporter (KERR et al. 2011).....	6
Abb. 2	Struktur des ABCG2-Transporters (TAYLOR et al. 2017).....	7
Abb. 3	Postulierter Transportmechanismus von Substraten durch den ABCG2-Transporter (TAYLOR et al. 2017).....	8
Abb. 4	Schematische Darstellung einer Alveole der Milchdrüse.....	16
Abb. 5	Schematische Darstellung pharmakologisch-relevanter Transporter, die im Rindereuter nachgewiesen wurden (LINDNER et al. 2013, YAGDIRAN et al. 2016).....	18
Abb. 6	Inlandsabsatz der Summe an Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffen (t) ohne inerte Gase seit 2007 (abgeleitet aus Tabelle 3.2 Inlandsabsatz an Wirkstoffen (t); Entwicklung seit 2007 (BVL 2017a)).	21
Abb. 7	Prinzip der WST-1 Reduktion (RODE 2008).....	37
Abb. 8	Schematische Darstellung des Hoechst 33342-Akkumulationsassays.	39
Abb. 9	Plattenlayout zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Interaktion von Pestiziden mit dem bovinen ABCG2-Transporter.....	40
Abb. 10	Plattenlayout zur Bestimmung der Wechselwirkungen von Pestiziden am bovinen ABCG2-Transporter.	42
Abb. 11	Ioxynil-spezifische Zellvitalität in MDCKII-bABCG2-Zellen.	48
Abb. 12	Prochloraz-spezifische Zellvitalität in MDCKII-bABCG2-Zellen.	49
Abb. 13	Ergebnisse des WST-1 Zytotoxizitätsassays für Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Diflufenican, Dimethoat, Dimethomorph und Glyphosat.	51
Abb. 14	Ergebnisse des WST-1 Zytotoxizitätsassays für Iprodion, Methiocarb, Rimsulfuron, Tebuconazol, Thiacloprid und Tolclofos-methyl.	52
Abb. 15	Effekt ausgewählter Pestizide auf die Hoechst 33342-Akkumulation in MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen.	55
Abb. 16	Effekt häufig gemeinsam detektierter Pestizidkombinationen auf die zelluläre Hoechst 33342-Akkumulation in MDCKII-Zellen.....	57
Abb. 17	Effekt im Handel erhältlicher Pestizidkombinationen auf die zelluläre Hoechst 33342-Akkumulation in MDCKII-Zellen.	58

Abbildungsverzeichnis

Abb. 18	Effekt von Glyphosat und Rimsulfuron, sowie deren Kombination auf die zelluläre Hoechst 33342-Akkumulation in MDCKII-Zellen.....	59
Abb. 19	Strukturformeln von Dimethomorph und Dimethoat.	67
Abb. 20	Strukturformeln von Chlorpyrifos-methyl und Chlorpyrifos.	67
Abb. 21	Strukturformel von Tolclofos-methyl.....	68
Abb. 22	Strukturformel von Glyphosat.	72
Abb. A 1	Strukturformeln von Diflufenican, Iprodion, Ioxynil, Methiocarb und Prochloraz.	109
Abb. A 2	Strukturformeln von Rimsulfuron, Tebuconazol und Thiacloprid.	110

1 Einleitung

Jährlich werden in Deutschland etwa 32 000 t Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe im Inland abgegeben und in der konventionellen Landwirtschaft, wie auch im privaten Bereich, eingesetzt (BVL 2017a). Pflanzenschutzmittel zählen gemeinsam mit den Bioziden zu den Pestiziden und umfassen dabei Stoffe, die lästige oder schädliche Lebewesen töten, vertreiben, sowie deren Wachstum oder deren Vermehrung hemmen (POTSCHKA et al. 2015). Sie werden daher in der konventionellen Landwirtschaft zur Verminderung von Ertragsausfällen eingesetzt. Jedoch können Rückstände der Pflanzenschutzmittel auf den Nutzpflanzen verbleiben und somit über die gewonnenen Futterpflanzen und Lebensmittel in die Nahrungskette eingetragen werden. (MCEWEN und MCNAB 1997, KHANIKI 2007, COM 2008). Insbesondere eine mögliche Anreicherung dieser Rückstände in tierischen Lebensmitteln, wie der Milch, birgt ein potentiell hohes Risiko für den Menschen, da die Hauptaufnahme von Pflanzenschutzmitteln über Rückstände in Lebensmitteln erfolgt (KHANIKI 2007, TSIPLAKOU et al. 2010, GALEA et al. 2015, PIRSAHEB et al. 2015). Im Rahmen des präventiven Verbraucherschutzes werden daher nach Verordnung (EG) 396/2005 Rückstandshöchstmengen (MRL, Maximum Residue Level) für Pestizide festgelegt, welche für tierische Produkte, wie der Milch, durch Fütterungsversuche an laktierenden Rindern ermittelt werden (OECD 2013). Diese MRL-Werte entsprechen den Rückstandskonzentrationen, die in pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln maximal erlaubt sind und nach aktuellem Wissensstand zu keiner Beeinträchtigung der Gesundheit des Menschen führen (BfR 2015, BVL 2017b). Sollte im Rindereuter die Möglichkeit einer aktiven Sekretion der Pestizide bestehen, könnten sich Fremdstoffe in tierischen Lebensmitteln, wie der Milch, anreichern. Da Milch und Milchprodukte zu den weltweit am häufigsten verzehrten Lebensmitteln zählen und sowohl deren Produktion als auch deren Verbrauch jährlich steigen, könnte eine Anreicherung potentiell gesundheitsschädlicher Fremdstoffe insbesondere für sensible Bevölkerungsgruppen wie Säuglinge, Kleinkinder und Schwangere, eine Gefahr darstellen (GEROSA et al. 2012). Persistente Chlorkohlenwasserstoffe, wie Hexachlorbenzol (HCB) und Dichlor-diphenyldichlorethen (p,p'-DDE), werden noch immer regelmäßig in Milch und Milchprodukten, wie Butter, im Rahmen des Warenkorb-Monitorings nachgewiesen, obwohl ihre Anwendung schon seit längerer Zeit verboten ist (BVL 2015a, BVL 2016b). Auch Rückstände derzeit häufig verwendeter Pflanzenschutzmittel, wie dem Fungizid Prochloraz, werden in Milch und Milchprodukten sporadisch im Warenkorb-Monitoring erfasst (EFSA 2008a, EFSA 2011c, EFSA 2011d). In den letzten 5 Jahren (2012 – 2016) konnte Prochloraz in

Einleitung

Goudakäse (2014), Butter (2015) und Milch (2016) in nicht quantifizierbaren Mengen detektiert werden (s. Tabelle A 2, S. 107, BVL 2016d, BVL 2016e, BVL 2017c). Nach der europäischen Pflanzenschutzmittel-Verordnung VO (EG) 1107/2009 und der Biozid-Verordnung EU 528/2012 dürfen zwar nur Pestizide in den Handel gelangen, deren Unbedenklichkeit nachgewiesen wurde, dennoch können geringe Gehalte von Rückständen in Lebensmitteln zu einer chronischen Belastung der Verbraucher führen (HAMILTON et al. 2004). So brachten die Autoren MOSTAFALOU und ABDOLLAHI (2013) eine chronische Pestizidexposition, auch in niedrigen Dosen, mit der Entstehung von Tumoren, z. B. Prostatakarzinomen, oder neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer, in Verbindung. Über ihre Wirkung als endokrine Disruptoren können einige Pestizide den Hormonhaushalt beeinflussen und zu Fruchtbarkeitsstörungen, sowie embryonalen Entwicklungsstörungen führen (KHANIKI 2007, MOSTAFALOU und ABDOLLAHI 2013). In der Öffentlichkeit stark diskutiert wird dabei auch die häufig gleichzeitige Aufnahme mehrerer Pestizidrückstände (REUTER 2012). Neben der Risikobewertung von Einzelstoffen gibt es seit einigen Jahren Bemühungen seitens der EFSA (European Food Safety Authority), Wechselwirkungen von Wirkstoffen im Rahmen einer kumulativen Risikobewertung zu berücksichtigen (BMEL et al. 2017). Jedoch fehlen bislang geeignete spezifische Modelle zur Beurteilung möglicher kombinatorischer Effekte (RIEKE et al. 2014).

In der Milchdrüse von Nagern wurde 2005 das zellmembranständige Transportprotein ABCG2 (ATP-Binding Cassette (ABC) Subfamilie G2) als zentrales Transportsystem für Fremdstoffe in die Milch identifiziert (JONKER et al. 2005). Aufgrund der erstmaligen Beschreibung an Chemotherapeutika-resistenten Brustkrebszellen 1998 ist auch die Bezeichnung „Breast Cancer Resistance Protein“ (BCRP) weit verbreitet (DOYLE et al. 1998). Dieser Effluxtransporter ist in der Lage, ein breites Spektrum an Fremdstoffen aktiv aus der Zelle zu transportieren und wird physiologisch in verschiedenen Organen, wie der Milchdrüse, dem Darm und der Leber, exprimiert (ITC 2010, JANI et al. 2014, MAO und UNADKAT 2015, NAGY et al. 2016). Durch die apikale Lokalisation an physiologischen Barrieren, wie der Blut-Plazenta-Schranke, schützt der ABCG2-vermittelte Efflux vor einer potentiell toxischen Anreicherung von Fremdstoffen (JANI et al. 2014, MAO und UNADKAT 2015). In der murinen, humanen und bovinen Milchdrüse ist der ABCG2-Transporter an der Ausbildung der Blut-Milch-Schranke beteiligt und wird mit Eintritt der Laktation vermehrt exprimiert (JONKER et al. 2005, LINDNER et al. 2013). Dieser membranständige Carrier vermittelt die aktive Sekretion sowohl von endogenen Verbindungen, wie Östrogen-3-Sulfat, als auch von veterinärmedizinisch-

Einleitung

relevanten Arzneimitteln, wie Monepantelsulfon, oder auch von Umweltkontaminanten, wie Benzo[a]pyren (SUZUKI et al. 2003, EBERT et al. 2005, MAHNKE et al. 2016). Ob Pflanzenschutzmittel zum Substratspektrum des bovinen ABCG2- (bABCG2) Transporters zählen und über diesen aktiv in die Milch sezerniert werden, ist bislang unbekannt. Daher sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob häufig angewendete Pflanzenschutzmittel mit dem bABCG2-Transporter interagieren und sich als mögliche Substrate in der Milch anreichern können. Darüber hinaus sollten mögliche synergistische Effekte von Mehrfachrückständen durch die gleichzeitige Inkubation mit verschiedenen Pflanzenschutzmitteln betrachtet werden. Sollten sich die zu untersuchenden Substanzen ABCG2-vermittelt in der Milch anreichern, könnten Analysen von z. B. Milchproben im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplans (NRKP) oder des Warenkorb-Monitorings zielgerichteter erfolgen.

Insgesamt verfolgt diese Arbeit das Ziel, durch die Etablierung eines *In-vitro*-Zellmodells und die Anwendung einfacher, schneller Nachweismethoden mögliche ABCG2-Substrate zu identifizieren und die Abschätzung von Verbraucherrisiken im Rahmen der Zulassungsverfahren zu erleichtern.

2 Literaturübersicht

2.1 Überblick über Membrantransporter

Die Zellmembran grenzt Zellen von ihrer Umgebung ab und ist für die meisten Stoffe undurchlässig, sodass der Stofftransport über Membranen nach der Energetik von Transportprozessen in passive und aktive Formen unterschieden werden kann: Passiver Transport über eine Membran erfolgt entlang des Konzentrationsgefälles durch einfache oder erleichterte Diffusion. Aktive Transportprozesse finden entgegen des Konzentrationsgradienten unter Energieverbrauch, wie der Spaltung von ATP (Adenosintriphosphat), statt und werden als Transporter im engeren Sinne bezeichnet (GRAEVE und MÜLLER 2014). Diese aktiven Membrantransporter werden entsprechend ihrer Transportrichtung in In- und Effluxtransporter eingeteilt (NAGY et al. 2016). Während Influxtransporter die Aufnahme von Nährstoffen und Fremdstoffen in die Zelle vermitteln, fördern Effluxtransporter die aktive Sekretion physiologischer Substrate und unerwünschter Fremdstoffe (Xenobiotika) aus der Zelle heraus (HEDIGER et al. 2004, HEDIGER et al. 2013, NAGY et al. 2016). Durch ihre organspezifische Lokalisation nehmen Membrantransporter Einfluss auf die Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Stoffen, wie beispielsweise Arzneimitteln (SCHINKEL und JONKER 2003).

ABC- (ATP-Binding Cassette) und SLC- (Solute Carrier) Transporter stellen die zwei größten Superfamilien der Membrantransporter dar (HEDIGER et al. 2004, ITC 2010, NAGY et al. 2016). Dabei umfassen die SLC-Transporter 52 Subfamilien, die durch 395 Gene kodiert werden, und durch erleichterte Diffusion oder sekundäre Transportmechanismen überwiegend Nährstoffe, wie Aminosäuren und Glukose, in die Zelle aufnehmen (HEDIGER et al. 2013). Von den über 400 verschiedenen SLC-Carriern sind die Subfamilie der OATPs (Organic Anion Transporting Polypeptide), der Anionentransporter (OAT, Organic Anion Transporter), der Kationentransporter (OCT, Organic Cation Transporter), der OCTNs (Organic Cation Transporter Novel) sowie der MATE-Transporter (Multidrug And Toxin Extruder) hauptverantwortlich für den Fremdstoffimport entlang physiologischer Barrieren (NAGY et al. 2016).

Hingegen können ABC-Transporter durch Hydrolyse von ATP energieabhängige Transporte durchführen und so eine Vielzahl an Xenobiotika aus der Zelle transportieren (HIGGINS 1992, BORST und ELFERINK 2002). Sie umfassen sieben Subfamilien (ABC A – G), die durch 49

Gene kodiert werden (VELAMAKANNI et al. 2007, NAGY et al. 2016). NAGY und Mitarbeiter (2016) beschreiben, dass die Subfamilien ABCA, ABCB, ABCC, ABCD und ABCG für den Transport über Membranen relevante Transmembrandomänen besitzen, während ABCE sowie ABCF diese nicht aufweisen und nach aktuellem Kenntnisstand nicht am aktiven Transport über Membranen beteiligt sind. Einige Mitglieder der ABC-Familie, wie die in Peroxisomen lokalisierte ABCD-Subklasse und der BSEP-Carrier (Bile Salt Export Pump, ABCB11) besitzen ein sehr enges Substratspektrum, das vorrangig physiologische Substrate, wie langkettige Fettsäuren oder Gallensalze, umfasst. Andere Mitglieder, wie das P-Glykoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1), Multidrug Resistance-associated Protein (MRP1 – 5, ABCC1 – 5) oder auch das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, MXR, ABCP, ABCG2) vermitteln hingegen den Transport eines breiten Spektrums an endogenen sowie exogenen Substanzen. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Xenobiotika wie Arzneimittel zu befördern, beeinflussen diese Transporter die Pharmakokinetik (Absorption, Distribution und Exkretion) von Arzneimitteln (ITC 2010, NAGY et al. 2016).

2.2 ABCG2-Effluxtransporter

2.2.1 Überblick

Der zur ABC-Familie gehörende Effluxtransporter ABCG2 wurde erstmals aus resistenten Brustkrebszellen der MCF-7/AdrVp-Zelllinie isoliert und dadurch als „Breast Cancer Resistance Protein“ (BCRP) benannt (DOYLE et al. 1998). Zeitgleich wurde eine starke Expression dieser Genssequenz in der Plazenta entdeckt, was zu der Bezeichnung „ATP-Binding Cassette Placenta“, kurz ABCP führte (ALLIKMETS et al. 1998). Ein Jahr später erfolgte der Nachweis der cDNA in Mitoxantron-resistenten Darmkrebszellen durch MIYAKE und Mitarbeiter (1999), was zur Bezeichnung MXR (Mitoxantrone Resistance Protein) führte. Erst später wurde das Transportprotein durch die HUGO (Human Genome Organisation) der Subfamilie G 2 der ATP-Binding Cassette (ABC) Efflux-Transporter zugeordnet und einheitlich als „ABCG2“ bezeichnet (ITC 2010). Nach der erstmaligen Beschreibung in humanen Zellen und Geweben, erfolgte der Nachweis auch in anderen Spezies, wodurch zur Unterscheidung zwischen Mensch und Nagetier Großbuchstaben (ABCG2/BCRP) oder kleine Buchstaben (Abcg2/Bcrp1) zur Benennung eingeführt wurden (NATARAJAN et al. 2012). Der ABCG2-Transporter rückte in den Fokus der Forschung, nachdem entdeckt wurde, dass die ABCG2-Expression an Krebszellen Chemotherapeutika-Resistenzen begünstigt und die

Wirkstoffverteilung von Arzneimitteln auch in physiologischen Geweben beeinflusst (MEYER ZU SCHWABEDISSEN und KROEMER 2011).

2.2.2 Struktur

Das humane ABCG2-Gen kodiert auf Chromosom 4q22 für ein 72 kDa großes Protein, das 655 Aminosäuren beinhaltet (ALLIKMETS et al. 1998). Bei milchliefernden Wiederkäuern (Rind, Schaf, Ziege) handelt es sich um ein 658 Aminosäuren-haltiges Protein mit 72 kDa und ist auf Chromosom 6 lokalisiert (WASSERMANN et al. 2013b). Der gleiche Transporter weist bei Mäusen sowie Ratten 657 und bei Kaninchen 656 Aminosäuren auf (ALLEN et al. 1999, HALWACHS et al. 2016b). Typischerweise besitzen alle Transporter der ABC-Familie vier Membran-assoziierte Domänen, von denen zwei als Nukleotid-bindende Domänen (NBD) die intrazelluläre Bindung sowie Hydrolyse von ATP ermöglichen (s. Abb. 1). Diese ATP-Spaltung stellt die Energie für den aktiven Transport entgegen des Konzentrationsgradienten über die Membran bereit (HIGGINS 1992). Zwei weitere hydrophobe Domänen durchspannen als Transmembrandomänen (TMD) die Membran jeweils sechsmal (α -Helices) und formen den Transportweg für die Substrate (HIGGINS 1992, JANI et al. 2014).

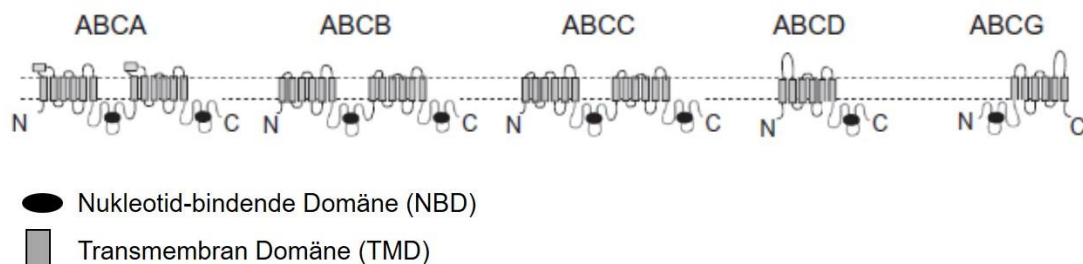


Abb. 1 Schematische Darstellung der Struktur der Subfamilien A – G der ABC-Transporter (KERR et al. 2011).

Im Vergleich zu anderen ABC-Transportern stellen der ABCD- und der ABCG2-Carrier jeweils Halbtransporter dar (s. Abb. 1), der eine intrazelluläre NBD und eine hydrophobe Domäne mit sechs TMD besitzt (MEYER ZU SCHWABEDISSEN und KROEMER 2011, JANI et al. 2014, TAYLOR et al. 2017). In der Literatur wurde bislang davon ausgegangen, dass der Transporter seine volle Funktionsfähigkeit nur durch die Bildung von Homodimeren oder Homooligomeren erfüllen kann (NI et al. 2010, JANI et al. 2014, SZAFRANIEC et al. 2014). TAYLOR und Mitarbeiter konnten 2017 erstmalig die Struktur des ABCG2-Transporters mittels Kryo-Elektronenmikroskopie darstellen und beweisen, dass der ABCG2-Transporter als Homodimer aus zwei identischen Halbtransportern funktional aktiv ist (s. Abb. 2). Das größte bislang nachgewiesene Oligomer besitzt zwölf identische Untereinheiten des

ABCG2-Halbtransporters, jedoch ist seine funktionelle Bedeutung bislang ungeklärt (XU et al. 2007). Für die Verbindung der Halbtransporter wurden von Cysteinresten ausgebildete Disulfidbrücken vermutet (NI et al. 2010). Die 3D-Analyse der Struktur zeigte, dass jeder ABCG2-Halbtransporter sechs TMD besitzt sowie eine lange extrazelluläre Schleife zwischen der TMD5 und TMD6 (s. Abb. 2). Diese extrazelluläre Schleife besitzt Cysteinreste (C), die sowohl intramolekulare Verbindungen (C592 – C608) innerhalb jedes Monomers, als auch eine intermolekulare Verknüpfung der zwei Halbtransporter (C603 – C603') ausbildet (TAYLOR et al. 2017). Bereits 2005 konnte jedoch belegt werden, dass die Ausbildung der Disulfidbrücken die Funktionalität des Transporters nicht beeinflusst (KAGE et al. 2005). Im Gegensatz zu den strukturverwandten ABCG5- und ABCG8-Transportern unterliegt das ABCG2-Protein einem sogenannten „Backbone Shift“, wodurch sich die TMD2 und TMD5 der zwei Monomere gegenüberliegen und eine zweigeteilte Tasche für die Substratbindung formen (TAYLOR et al. 2017).

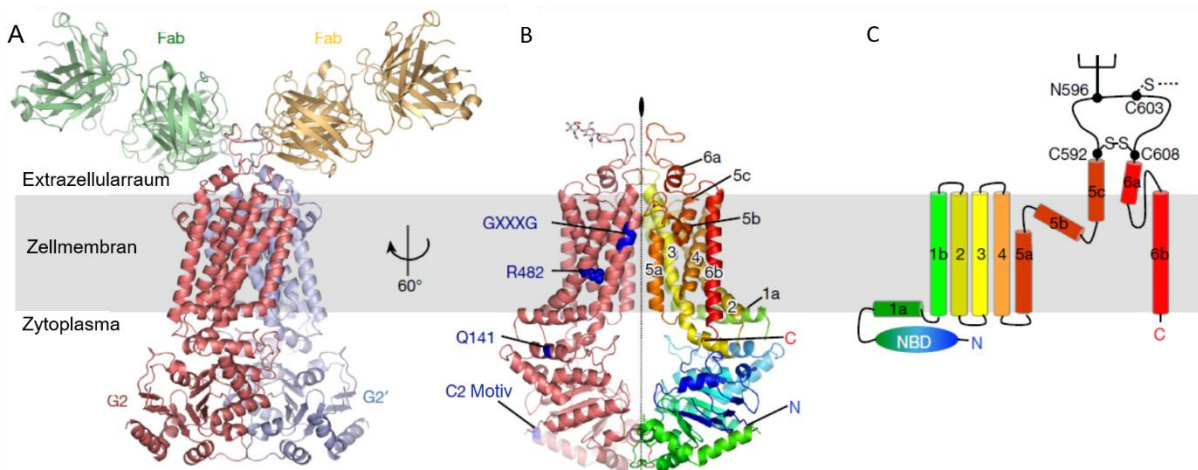


Abb. 2 Struktur des ABCG2-Transporters (TAYLOR et al. 2017). **A.** Schematische Darstellung des humanen ABCG2-Proteins, das für die Kristallisation mit Antigen-bindenden Fragmenten (Fab) markiert wurde. **B.** Darstellung des Homodimers mit in Regenbogenfarben-markierten Transmembrandomänen (1 – 6), sowie der literaturbekannten Punktmutationen Q141, R482 und GXXXG. **C.** Schematische Darstellung eines ABCG2-Monomers mit in Regenbogenfarben-markierten Transmembrandomänen (1 – 6), sowie Lokalisation der Cysteinreste (C592, C603, C608).

2.2.3 ABCG2-Transportmechanismus

Wie alle ABC-Transporter besitzt auch der ABCG2-Carrier eine basale ATPase-Aktivität, die den aktiven Transport von Fremdstoffen über Membranen ermöglicht. Diese ist jedoch niedriger und durch ABCG2-Substrate weniger induzierbar als die ATPase-Aktivität von MDR1 (NI et al. 2010). Neben der Struktur haben TAYLOR et al. (2017) erstmalig einen Transportmechanismus für Substrate postuliert (s. Abb. 3). Die Substrat-bindende Tasche 1 ist zum Zytoplasma hin geöffnet und ermöglicht die Aufnahme flacher, polyzyklischer und v. a. hydrophober Substrate aus dem Zellinneren sowie dem inneren Teil der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran (s. Abb. 3 A). Die kleinere zweite Bindungstasche ist leer und verschlossen. Die Substratbindung induziert, vermutlich durch die Annäherung der NBD der einzelnen Monomere, die ATPase-Aktivität. Nachfolgend führt die Substrat- und ATP-Bindung zur Konformationsänderung des ABCG2-Transporters (s. Abb. 3). Die Tasche 1 wird geschlossen und Tasche 2 geöffnet, wodurch das Substrat in die hydrophobere Tasche bewegt wird. Aufgrund der geringeren Bindungsaffinität der Bindungstasche 2 wird das Substrat in den Extrazellularraum freigegeben (TAYLOR et al. 2017).

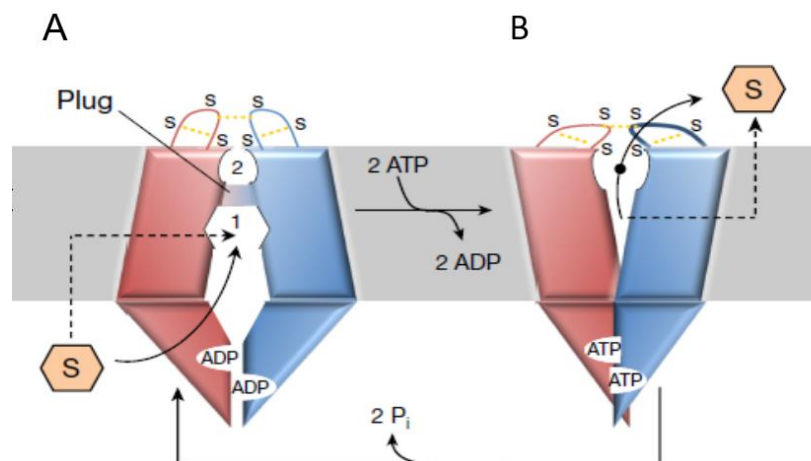


Abb. 3 Postulierter Transportmechanismus von Substraten durch den ABCG2-Transporter (TAYLOR et al. 2017). **A.** Ein Substrat wird aus dem Zytoplasma oder der inneren Schicht der Phospholipid-Doppelmembran aufgenommen und in der Bindungstasche 1 gebunden. **B.** Infolge der zeitgleichen Bindung von ATP erfolgt eine Konformationsänderung und das Substrat wird über die Tasche 2 in den Extrazellularraum entlassen.

2.2.4 Spezifität der ABCG2-Substrate und Inhibitoren

Der ABCG2-Transporter weist ein breites Substratspektrum auf und transportiert neben hydrophoben Verbindungen auch hydrophile Anionen und Kationen, sowie Phase II-Konjugate (JANI et al. 2014). Für den Transport der Substrate vermuteten HIGGINS und Mitarbeiter bereits 1992 Bindungsstellen innerhalb der TMD der ABC-Transporter. Einige Studien weisen auf multiple Bindungsstellen innerhalb der TMD hin. So konnte gezeigt werden, dass die ABCG2-Substrate Doxorubicin, Prazosin und Daunomycin den Transport des radioaktiven Markersubstrates $^3\text{[H]}$ -Daunomycin nahezu vollständig hemmen. Hingegen beeinflussten die ABCG2-Substrate Rhodamin 123 und Methotrexat die Transportrate des radioaktiv-markierten Substrates nicht. Die Autoren schlussfolgerten, dass Doxorubicin, Prazosin, Daunomycin und $^3\text{[H]}$ -Daunomycin an der gleichen Bindungsstelle innerhalb des Transportproteins binden, während Rhodamin 123 und Methotrexat eine Affinität zu einer anderen Stelle besitzen (NI et al. 2010). Einige Autoren mutmaßten, dass die Aminosäure Arginin 482 für die Substratspezifität von ABCG2 relevant sei (VELAMAKANNI et al. 2007, SZAFRANIEC et al. 2014). Jedoch ging aus der Strukturanalyse des ABCG2-Transporters hervor, dass sich Arginin 482 außerhalb der Bindungstasche befindet. Demnach schlussfolgerten die Autoren, dass vermeintliche Substrate nicht innerhalb der Bindungstasche, sondern außerhalb an Arginin 482 binden. Durch die anschließende Änderung der Allosterie wird die Substratspezifität von ABCG2 beeinflusst (TAYLOR et al. 2017). Diese Annahme bestätigt die von NI et al. (2010) beschriebenen Beobachtungen, dass der ABCG2-Wildtyp ein anderes Substratspektrum aufweist als ABCG2-Mutationen, die als 482. Aminosäure Threonin oder Glycin anstatt Arginin enthalten.

Bislang gibt es keine wissenschaftlich anerkannte Zuordnung von chemischen Eigenschaften, die einen Stoff als ABCG2-Substrat oder Inhibitor klassifizieren. SZAFRANIEC et al. (2014) fassten folgende chemischen Struktur Gemeinsamkeiten zusammen, die den bisher bekannten ABCG2-Substraten gemeinsam sind: Es sind hydrophile oder lipophile Verbindungen, die hydrophobe Regionen oder Aromaten beinhalten und sie weisen sieben bis 20 Kohlenstoffatome auf. Weiterhin werden geladene Moleküle mit einer flachen Konformation durch den ABCG2-Transporter bevorzugt. ABCG2-Substrate können außerdem Metallionen, Sauerstoff- oder Stickstoffgruppen enthalten. Anhand der Struktur des ABCG-Transporters wurde bestätigt, dass flache, polyzyklische, aber v. a. hydrophobe Stoffe als Substrate fungieren (TAYLOR et al. 2017).

Während die physiologische Funktion des ABCG2-Transporters nicht endgültig geklärt ist, wurden bereits einige endogene Substrate nachgewiesen. Körpereigene photosensibilisierende Stoffe, wie Porphyrin und sein Metabolit Protoporphyrin IX, werden z. B. aus hämatopoetischen Zellen sowie Hepatozyten durch den humanen ABCG2-Transporter (hABCG2) aktiv sezerniert (JONKER et al. 2002, ZHOU et al. 2005). Weiterhin werden Konjugate aus der Phase II der Biotransformation, wie Östrone-3-sulfat, Dehydroepiandrosteron (DHEAS) oder 17 β -Östradiol durch den Effluxtransporter transportiert (SUZUKI et al. 2003, MAO und UNADKAT 2005, MAO und UNADKAT 2015). Auch Harnsäure wird im proximalen Tubulus der Niere u. a. ABCG2-vermittelt sezerniert (JANI et al. 2014). Neben endogenen Stoffen gehören auch etliche Arzneimittel, wie Chemotherapeutika, Kalziumkanalblocker, Virostatika und verschiedene Antibiotika, insbesondere Fluorchinolone, dem humanen ABCG2-Substratspektrum an (MEYER ZU SCHWABEDISSEN und KROEMER 2011, SZAFRANIEC et al. 2014, MAO und UNADKAT 2015). Weiterhin werden auch potentiell kanzerogene Substanzen, wie Aflatoxin B1, PhIP (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin), sowie Benzo[a]pyren und seine Metabolite ABCG2-vermittelt aus der Zelle transportiert (EBERT et al. 2005, VAN HERWAARDEN et al. 2006). Auch Farbstoffe, wie Hoechst 33342, stellen ABCG2-Substrate dar und werden für den Nachweis der ABCG2-Transportaktivität genutzt (KIM et al. 2002, SCHARENBERG et al. 2002). So konnten im indirekten Hoechst-Akkumulationsassay verschiedene Pestizide, wie beispielsweise Chlorpyrifos und Diflufenican, als mögliche Substrate des plazentaren ABCG2-Transporters des Kaninchens identifiziert werden (HALWACHS et al. 2016a). Weitere Beispiele für ABCG2-Substrate finden sich in verschiedenen Übersichtsartikeln (MAO und UNADKAT 2005, SARKADI et al. 2006, POLGAR et al. 2008, ROBEY et al. 2009, MEYER ZU SCHWABEDISSEN und KROEMER 2011, JANI et al. 2014, SZAFRANIEC et al. 2014, MAO und UNADKAT 2015).

Die Entwicklung spezifischer ABCG2-Inhibitoren steht insbesondere im Rahmen der Tumorthherapie seit Jahren im Fokus der Forschung (PEÑA-SOLÓRZANO et al. 2017). Dabei wirken diätetische Flavonoide, wie Chrysin und Biochanin A und andere pflanzliche Extrakte, inhibitorisch auf die ABCG2-Effluxaktivität und ermöglichen so eine Umgehung der ABCG2-induzierten Chemotherapeutikaresistenz (TAMAKI et al. 2010). In zwei Studien konnte gezeigt werden, dass organochlorhaltige Pestizide (Endosulfan, Chlordan, Heptachlor, Chlordecon, Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und seine Metabolite) sowie Pyrethroidpestizide (Permethrin, Resmethrin) den humanen ABCG2-Transporter inhibieren (BIRCSAK et al. 2013, BUCHER et al. 2014). Hochpotente Wirkstoffe, die in geringen Konzentrationen (nM) ABCG2

inhibieren, sind Fumitremorgin C (FTC) und sein synthetisches Analogon Ko143 (ALLEN et al. 2002), GF120918 (DE BRUIN et al. 1999), sowie Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Gefitinib (LEGGAS et al. 2006). Der stärkste Inhibitor ist hierbei FTC und dessen weniger neurotoxischen Derivate Ko132, Ko134 und Ko143, wobei Ko143 mit einem IC_{50} von 23 – 26 nM die höchste inhibitorische Aktivität aufweist (ALLEN et al. 2002). Deswegen finden FTC und Ko143 *In-vitro* eine breite Anwendung als Referenzinhibitoren für die Identifikation neuer therapeutisch-einsetzbarer ABCG2-Inhibitoren (ITC 2010, MEYER ZU SCHWABEDISSEN und KROEMER 2011). Die Zugabe spezifischer Inhibitoren, wie Ko143 zur Inhibition von ABCG2, wird in der pharmakologischen Forschung genutzt, um Resistenzmechanismen in Tumoren zu umgehen und die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika in Tumorzellen zu erhöhen (SCHINKEL und JONKER 2003, HASANABADY und KALALINIA 2016). Gleichzeitig dienen diese Inhibitoren auch zur näheren Charakterisierung, z. B. als Kontrolle, ob eine Substratsekretion ABCG2 vermittelt wird (HEGEDUS et al. 2009, MEYER ZU SCHWABEDISSEN und KROEMER 2011). Zusätzlich können einige Substanzen, wie GF120918, als duale Inhibitoren sowohl ABCG2 als auch MDR1 hemmen (DE BRUIN et al. 1999). Eine Zusammenstellung bekannter ABCG2-Inhibitoren geben die Autoren MAO und UNADKAT (2005), SARKADI et al. (2006), AHMED-BELKACEM et al. (2006), POLGAR et al. (2008), ROBEY et al. (2009), MEYER ZU SCHWABEDISSEN und KROEMER (2011), MAO und UNADKAT (2015), sowie PEÑA-SOLÓRZANO et al. (2017) in ihren Übersichtsartikeln. Ferner gibt es Substanzen, die sowohl ABCG2-Substrate als auch Inhibitoren und gleichzeitig Modulatoren der ABCG2-Expression sind. Dazu zählen z. B. Isoflavone, die in der Nahrung vorkommen (BIRCSAK und ALEKSUNES 2015).

2.2.5 Gewebeexpression

Nach der Entdeckung in resistenten Tumorzelllinien konnte der ABCG2-Transporter 2001 erstmals in verschiedenen, unveränderten Geweben nachgewiesen werden (MALIEPAARD et al. 2001). MALIEPAARD und Mitarbeiter (2001) konnten die ABCG2-Expression sowohl mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) als auch immunhistochemisch in physiologischen, humanen Gewebeproben zeigen. Demnach wird ABCG2 apikal im Dünndarm- und Kolonepithel, gallengangseitig in Hepatozyten, sowie in Milchgängen und im Alveolarepithel der Milchdrüse exprimiert. Mittlerweile ist außerdem eine ubiquitäre Expression des Proteins im Endothel von Venen und Kapillaren bekannt (ITC 2010, JANI et al. 2014, MAO und UNADKAT 2015). Den erstmaligen Nachweis der vermehrten Genexpression von ABCG2 in

humanen, plazentaren Synzytiotrophoblasten erbrachten ALLIKMETS et al. (1998) und wurde von MALIEPAARD et al. (2001) immunhistochemisch bestätigt. Weitere immunhistochemische Beweise des ABCG2-Proteins beim Menschen erfolgten für das Epithel der Lunge, Harnblase, Hoden, Prostata, Uterus, Cervix, Pankreas (Langerhans-Inseln und Azinuszellen), Niere, Gallenblase, Konjunktiva und Retina (AUST et al. 2004, FETSCH et al. 2006, HULS et al. 2008, CHEN et al. 2013). Für Dünndarm und Leber wurde zusätzlich die mRNA Expression des Carriers belegt (NISHIMURA und NAITO 2005, TUCKER et al. 2012). Außerdem konnte der ABCG2-Transporter in einer Subgruppe von Stammzellen verschiedener Gewebe, wie Myometrium (ONO et al. 2007), Skelettmuskulatur (UEZUMI et al. 2006), Milchdrüse (ALVI et al. 2003), Herz (OH et al. 2004), Pankreas (LECHNER et al. 2002) und Leber (HUSSAIN et al. 2005) gefunden werden. Obwohl seine Funktion in den Stammzellen noch unklar ist, wird eine Schutzfunktion des ABCG2-Transporter gegen äußere Noxen vermutet (MEYER ZU SCHWABEDISSEN und KROEMER 2011). Studien an verschiedenen Säugetierarten zeigten, dass dieser Membrantransporter auch in Darm, Leber, Niere, Lunge, Milchdrüse und Retina bei Hunden, Katzen, Pferden sowie bei milchliefernden Wiederkäuern exprimiert wird (TYDÉN et al. 2010, HALLER et al. 2012, MEALEY 2012, LINDNER et al. 2013, JANI et al. 2014).

Einige Autoren beschreiben, dass die Proteinexpression gewebe- und speziesspezifisch verteilt ist (MEYER ZU SCHWABEDISSEN und KROEMER 2011, JANI et al. 2014). JANI und Mitarbeiter (2014) fassten in ihrer Übersicht Studien zur ABCG2-Verteilung im Darm von Mensch und Hund zusammen. Dabei konnten sie feststellen, dass die Expression von ABCG2 sowohl beim Mensch als auch beim Hund vom Duodenum zum Rektum hin abnimmt. Jedoch weisen Menschen verhältnismäßig mehr ABCG2 als MDR1 im Jejunum auf, während Hunde im gesamten Darmkonvolut eine höhere MDR1- als ABCG2-Expression zeigen. Für die laktierende Milchdrüse jedoch konnte speziessübergreifend (Maus, Mensch, Rind, Schaf, Ziege) belegt werden, dass der ABCG2-Transporter im Vergleich zu anderen ABC-Transportern am stärksten exprimiert wird (JONKER et al. 2005, VAN HERWAARDEN et al. 2006, LINDNER et al. 2013, JANI et al. 2014, YAGDIRAN et al. 2016).

2.2.6 Bedeutung

Insgesamt wird der ABCG2-Transporter in physiologischen Geweben nahezu ubiquitär exprimiert und beeinflusst durch seine apikale Lokalisation die Pharmakokinetik von ABCG2-Substraten (FETSCH et al. 2006, SZAKÁCS et al. 2008, ITC 2010, MAO und UNADKAT 2015, NAGY et al. 2016). Im Dünndarm eliminiert ABCG2 Substrate aus den Enterozyten und

limitiert dadurch deren orale Bioverfügbarkeit (SZAKÁCS et al. 2008, ITC 2010, NAGY et al. 2016). Durch die Expression an physiologischen Barrieren, wie Blut-Hirn-Schranke oder Blut-Plazenta-Schranke, wird zudem die Verteilung von Arzneimitteln und an Leber sowie Niere die Elimination beeinflusst (NI et al. 2010, NAGY et al. 2016). In der Humanmedizin sind etliche Polymorphismen des Transportproteins bekannt, die mit einer reduzierten ABCG2-Aktivität einhergehen und durch eine veränderte Pharmakokinetik verstärkte Nebenwirkungen der angewandten Arzneimittel verursachen (MEALEY 2012, JANI et al. 2014). Analog dazu konnte für Katzen gezeigt werden, dass eine ABCG2-Mutation infolge der Anreicherung von Fluorchinolonen zu einer phototoxischen Zerstörung der Retina führt (RAMIREZ et al. 2011). Diese Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung des ABCG2-Transporters für die Pharmakokinetik von Arzneimitteln.

Durch die Lokalisation an physiologischen Barrieren schützt der ABCG2-Carrier sensible Gewebe und Organsysteme vor der Belastung mit potentiell schädlichen Fremdstoffen, indem diese aktiv eliminiert werden (LESLIE et al. 2005, VAN HERWAARDEN und SCHINKEL 2006, JANI et al. 2014, MAO und UNADKAT 2015). So ist der ABCG2-Transporter an der Blut-Plazenta-Schranke apikal in den Synzytiotrophoblasten lokalisiert und transportiert aktiv Fremdstoffe vom Fötus zur Mutter (ALLIKMETS et al. 1998, HALWACHS et al. 2016b). An physiologischen Barrieren, wie der Blut-Hirn-Schranke, sind MDR1 und ABCG2 häufig gleichzeitig exprimiert (NAGY et al. 2016). Aufgrund ihres teilweise überlappenden Substratspektrums haben sie synergistische Effekte auf die Elimination von Fremdstoffen (ITC 2010, NI et al. 2010).

In der Onkologie kann eine vermehrte Expression von MDR1, MRP1 oder ABCG2 eine verminderte, intrazelluläre Akkumulation von Arzneimitteln verursachen und so beispielsweise Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika begünstigen (DOYLE et al. 1998, NATARAJAN et al. 2012, FLETCHER et al. 2016, HASANABADY und KALALINIA 2016). So ist bekannt, dass eine Überexpression von ABCG2 in humanen Mammakarzinomen zu Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika führt (DOYLE et al. 1998, NATARAJAN et al. 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der ABCG2-Transporter unter pathologischen Bedingungen, wie z. B. in hypoxischen Geweben, hochreguliert wird. Dies führt zu der Vermutung, dass der ABCG2-Transporter auch bei Abweichungen vom physiologischen Zustand ein Schutzmechanismus für die Zelle darstellt (NISHIIHASHI et al. 2017).

2.2.7 Regulation der ABCG2-Transportaktivität

Das Besondere an ABC-Transportern ist deren Induzierbarkeit, welche erstmals 1976 für MDR1 gezeigt werden konnte (JULIANO und LING 1976, JANI et al. 2014). Neben der Regulation durch Hormone kann die Genexpression von Effluxtransportern über zytoplasmatische Kernrezeptoren von Fremdstoffen angeregt werden (SCHRICKX und FINK-GREMMELS 2008, TIRONA 2011). Nach Ligandenbindung translozieren diese in den Nukleus, wo sie als Heterodimer an regulatorische Elemente innerhalb der Promoterregion binden und zu einer Veränderung der Transkriptionsrate der Zielgene führen (TIRONA 2011). Das ABCG2-Gen umfasst 15 Introns und 16 Exons, wobei die Translation in Exon 2 startet und in Exon 16 endet. Die Promoterregion mit den Regulationselementen befindet sich –300 bis –50 Basenpaare vor dem Translationsstart (BAILEY-DELL et al. 2001). Mittlerweile ist auch bekannt, dass Modifikationen in Exon 1 beim Menschen gewebsspezifische Splicingvarianten hervorrufen (NAKANISHI und ROSS 2012).

Verschiedene Kernrezeptoren beeinflussen die ABCG2-Expression (PUGA et al. 2009, TIRONA 2011, NATARAJAN et al. 2012), von denen der Pregnan-X-Rezeptor (PXR), der konstitutive Androstanrezeptor (Constitutive Androstane Receptor, CAR) und der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) zu den sogenannten xenobiotischen Rezeptoren zählen. Diese können durch Fremdstoffbindung die Gentranskription von bestimmten Phase I- und Phase II-Enzymen sowie von Effluxtransportern, wie dem ABCG2-Transporter, regulieren (s. Tabelle 1, S. 15, MACKOWIAK und WANG 2016).

Einige Autoren beschreiben, dass die Induktion des ABCG2-Transporters durch Pestizide AhR-vermittelt erfolgt (DENISON und HEATH-PAGLIUSO 1998, LONG et al. 2003, HALWACHS et al. 2013, HALWACHS et al. 2014). Klassische Liganden des AhR sind polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe, z. B. 3-Methylanthren, oder halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe, z. B. 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (s. Tabelle 1, S. 15, DENISON und NAGY 2003, PUGA et al. 2009, MACKOWIAK und WANG 2016). Diese vorrangig planaren, hydrophoben Liganden diffundieren über die Zellmembran und binden an den zytoplasmatischen Ah-Rezeptor, der im Zytoplasma inaktiv in einem Komplex mit Hitzeschockprotein 90 (HSP90), XAP2 (hepatitis B virus protein X-Associated Protein 2) und p23 vorliegt (PUGA et al. 2009, MACKOWIAK und WANG 2016). Der Komplex aus Ligand, AhR und HSP90 transloziert in den Zellkern, HSP90 dissoziiert ab und das Heterodimer bindet mit ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) an Dioxine Responsive Elements (DRE oder XRE) innerhalb der Promoterregion des ABCG2-

Gens und stimuliert dessen Transkription (PUGA et al. 2009, JANI et al. 2014, MACKOWIAK und WANG 2016). Infolge der Ligandenbindung kann es je nach Art des Liganden zu einer unterschiedlichen allosterischen Ausbildung des Heterodimers kommen, was in einer unterschiedlichen Intensität der Gentranskription mündet (TIRONA 2011). Nachfolgend wird der aktivierte AhR zurück ins Zytoplasma transportiert und im Proteasom abgebaut (PUGA et al. 2009). Neben diesem direkten, Liganden-abhängigen Weg werden auch Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen in der Literatur beschrieben. So kann der AhR auch Liganden-unabhängig durch cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) oder durch den Tyrosinkinase-Signalweg aktiviert werden (MACKOWIAK und WANG 2016).

Tabelle 1 Übersicht über Kernrezeptoren, ihre klassischen Liganden und ausgewählte Zielgene (MACKOWIAK und WANG 2016).

Kernrezeptor	klassische Zielgene		klassische Liganden	
	Transporter	Enzyme	endogen	exogen
CAR	ABCG2	CYP2B	Testosteron-Metaboliten	CITCO TCPOBOP
PXR	ABCG2	CYP3A4	Steroidhormone und -metaboliten Vitamine Gallensäuren	Makrolid-Antibiotika Flavonoide
AhR	ABCG2	CYP1A1 CYP1A2 CYP1B1 UGT1A-Familie	Bilirubin Tryptophan-Derivate	TCDD 3-Methylanthren

CITCO: 6-(4-Chlorphenyl)imidazo[2,1-beta][1,3]thiazol-5-carbaldehyde-*O*-(3,4-dichlorbenzyl)oxim, CYP: Cytochrom P450, TCDD: 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin, TCPOBOP: 1,4-bis[2-(3,5-dichlorpyridyloxy)]benzen, UGT1A: UDP-Glucuronosyl-transferase 1A

2.3 Fremdstoffsekretion der bovinen Milchdrüse

2.3.1 Funktionelle Anatomie

Die Milchdrüse stellt eine tubuläre Drüse mit epithelialer Auskleidung dar, deren Drüsenparenchym durch Bindegewebe, dem Interstitium, in Drüsenläppchen untergliedert wird. Diese Drüsenläppchen bestehen aus Milch-sezernierenden Alveolen, leitenden Milchgängen (Ductus lactiferi) und Milchsammelräumen (Sinus lactiferi) (LIEBICH 1990). Die Alveolen werden von Laktozyten, die als einschichtiges Epithel der Basalmembran aufsitzen, ausgekleidet. Außerhalb der Basalmembran werden die Alveolen von Myoepithelzellen umschlossen, die unter Oxytocineinfluss die Milchejektion auslösen (s. Abb. 4).

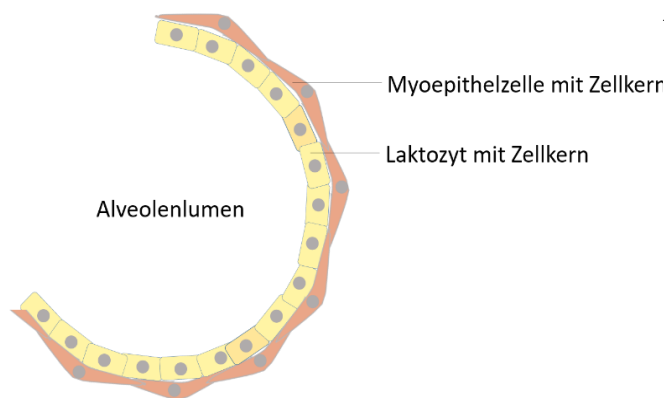


Abb. 4 Schematische Darstellung einer Alveole der Milchdrüse. Myoepithelzellen umgeben sezernierende Laktozyten, die als einschichtiges Epithel die Alveolen der Milchdrüse auskleiden (modifiziert nach LIEBICH 1990).

Das Bindegewebe zwischen den Alveolen ist stark vaskularisiert, um eine ideale Nährstoffbereitstellung für die Laktozyten zu gewährleisten. Die Blut-Milch-Schranke besteht zum einen aus dem Endothel und der Basalmembran der Blutgefäße und zum anderen aus der Basalmembran und den anliegenden Laktozyten. Zell-Zell-Kontakte, insbesondere Tight Junctions, verbinden die Laktozyten so dicht miteinander, dass während der Laktation eine effiziente Barriere ausgebildet wird (SOBOTTA und WELSCH 2006). Diese physiologische Blut-Milch-Schranke bewirkt, dass Stoffe in die Milch vorrangig transzellulär transportiert werden (MCMANAMAN und NEVILLE 2003, SOBOTTA und WELSCH 2006, STELWAGEN und SINGH 2014). Tight Junctions bilden zwar eine dichte Barriere aus, regulieren aber auch den parazellulären Transport von Ionen und kleinen Molekülen (STELWAGEN und SINGH 2014).

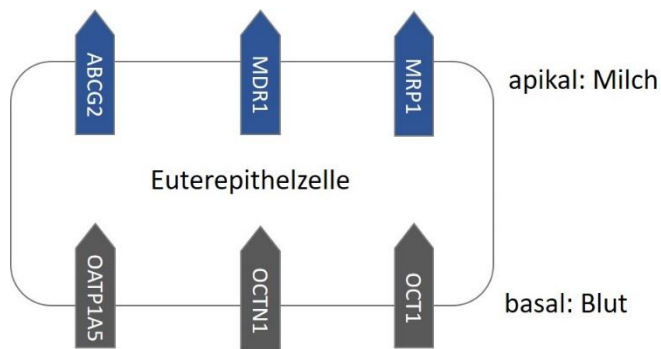
2.3.2 Transportmechanismen

Während der Laktation unterteilen Tight Junctions durch ihre dichten Verschlussleisten das Alveolarepithel in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment. Der dadurch entstehende elektrische Widerstand ist verantwortlich für die Polarität des Alveolarepithels und stellt die

Voraussetzung für gerichtete Transportvorgänge dar. Aufgrund vieler Tight Junctions wird der parazelluläre Transportweg innerhalb der Laktation enorm reduziert, sodass ausschließlich transzelluläre Transportvorgänge im gesunden, laktierenden Euter vorkommen (MCMANAMAN und NEVILLE 2003, SOBOTTA und WELSCH 2006, STELWAGEN und SINGH 2014, STELWAGEN und SINGH 2014). MCMANAMAN und NEVILLE (2003) unterscheiden die Transportvorgänge in der Milchdrüse in vier transzelluläre und einen parazellulären Transportweg durch geöffnete Tight Junctions. Die Transportwege I und II stehen vorrangig den in der Milchdrüse synthetisierten Bestandteilen zur Verfügung, während die Wege III und IV den Transport exogener Substanzen in die Milch ermöglichen. Transportweg I dient der Exozytose von Proteinen, Laktose, Kalzium und weiterer hydrophiler Komponenten. Transportweg II umfasst die apokrine Sekretion durch die apikale Verschmelzung der Fettvesikel mit der Zellmembran. Der III. Transportweg befördert größere Proteine durch vesikuläre Transzytose. Hierbei wird über die basale endozytotische Aufnahme mit nachfolgender Endosomenbildung und abschließender apikaler Exozytose der transzelluläre Transport von Makromolekülen, wie Lipoproteinen und Immunglobulinen, ermöglicht. Eine Rolle für den Fremdstofftransport in die Milch wird diskutiert. Der IV. Transportmechanismus umfasst den aktiven Stofftransport über spezifische Carriersysteme basal, apikal und in der Golgi-Membran. Dabei werden Elektrolyte, Glucose und Aminosäuren über diese Wege in die Milch transportiert, wobei der apikale Transportmechanismus für Glucose und Aminosäuren nicht abschließend erforscht ist. Der parazelluläre Transportweg V ermöglicht den Übergang von Leukozyten und Plasmabestandteilen in die Milch. Dieser Transportweg steht exklusiv in der Schwangerschaft, Trächtigkeit, Involution und während einer Mastitis zur Verfügung.

2.3.3 Fremdstofftransporter

Bislang konnten sowohl Membrantransporter der SLC-Familie, wie OCT1, OCTN1 und OATP1A5, als auch ABCB1, ABCC1 und ABCG2 der ABC-Familie als relevante Fremdstofftransporter in der bovinen Milchdrüse identifiziert werden, die in Abhängigkeit des Laktationszustandes in ihrer Expression variieren (s. Abb. 5, JONKER et al. 2005, LINDNER et al. 2013, YAGDIRAN et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass ABCG2 und OCT1 im laktierenden Rindereuter stärker exprimiert werden als im nicht-laktierenden Gewebe. Hingegen wird die Expression von MDR1, MRP1, OATP1A5, sowie OCTN1 während der Laktation vermindert (YAGDIRAN et al. 2016).

**Abb. 5**

Schematische Darstellung pharmakologisch-relevanter Transporter, die im Rinder-euter nachgewiesen wurden (LINDNER et al. 2013, YAGDIRAN et al. 2016). Grau unterlegt: SLC-Familie. Blau unterlegt: ABC-Familie.

OCT1, OCTN1 und OATP1A5 vermitteln den Influx von Stoffen und können durch ihr breites Substratspektrum auch Arzneimittel in die Zelle aufnehmen (NAGY et al. 2016). Demnach stellt der ABCG2-Transporter den Haupttransportweg für Fremdstoffe in die Milch dar und kann aufgrund seines breiten Substratspektrums (s. 2.2.4) verschiedene Substrate aktiv in die Milch sezernieren (JONKER et al. 2005). Der ABCG2 ist in der apikalen Membran der Laktozyten lokalisiert und wurde als wichtiger Fremdstoff-sezernierender Transporter in der humanen, murinen, caprinen, ovinen und bovinen Milchdrüse identifiziert (JONKER et al. 2005, LINDNER et al. 2013, YAGDIRAN et al. 2016). Untersuchungen zum ABCG2-Substratspektrum im Euter milchliefernder Tiere erfolgen überwiegend an speziesspezifischen, ABCG2-überexprimierenden MDCKII-Zellmodellen oder durch die Ermittlung der Milch-Plasma-Rate eines Stoffes in Tierversuchen (JONKER et al. 2000, MERINO et al. 2005a, MERINO et al. 2005b, WASSERMANN et al. 2013a, WASSERMANN et al. 2013b, GONZÁLEZ-LOBATO et al. 2014, HALWACHS et al. 2016a, MAHNKE et al. 2016, BALLENT et al. 2018).

Aus der Literatur geht hervor, dass ABC-Transporter ein speziesspezifisches Substratspektrum besitzen (SCHRICKX und FINK-GREMMELS 2008). WASSERMANN et al. (2013b) konnten darüber hinaus belegen, dass sich auch das Substratspektrum von ABCG2 bei verschiedenen milchliefernden Wiederkäuern unterscheidet. So konnte beispielsweise für Oxfendazol gezeigt werden, dass es ein Substrat des murinen und bovinen ABCG2-Transporters ist, jedoch für den humanen, ovinen und caprinen Carrier kein Substrat darstellt (MERINO et al. 2005b, WASSERMANN et al. 2013a, BALLENT et al. 2018). Zum Substratspektrum des mammären, bovinen ABCG2- (bABCG2) Transporter gehören Veterinärpharmaka, wie Enrofloxacin, Danofloxacin, Difloxacin, Ciprofloxacin, Cefalexin und Lincomycin, sowie Eprinomectin, Moxidectin, Natriumsalicylat, Equol, Quercetin und Monepantelsulfon (REAL et al. 2011, WASSERMANN et al. 2013a, WASSERMANN et al. 2013b, MAHNKE et al. 2016, OTERO et al. 2016b). Auch Mykotoxine, wie Aflatoxin B1 und

M1, sowie endogene Substanzen, wie Harnsäure und Enterolakton, konnten als potentielle bABCG2-Substrate identifiziert werden (OTERO et al. 2016a, MANZINI et al. 2017). Die Bedeutung des ABCG2-Transporters für den Folsäurehaushalt wird in der Literatur widersprüchlich gewertet (ASSARAF 2006, VAN HERWAARDEN und SCHINKEL 2006). Während *In-vitro*-Versuche Folate als ABCG2-Substrate ermittelten, konnte in *Abcg2*^{-/-} Mäusen keine verminderten Folatgehalte in der Milch oder Fehlernährungen der Nachkommen nachgewiesen werden (VAN HERWAARDEN und SCHINKEL 2006). Auch Riboflavin wurde *In-vitro* als Substrat identifiziert, jedoch konnte *In-vivo* kein veränderter Riboflavingehalt in der Milch detektiert werden (OTERO et al. 2016a).

2.3.4 Bedeutung des ABCG2-Transporters

ABC-Transporter können an physiologischen Barrieren die Pharmakokinetik von Arzneimitteln, sowie die Toxikokinetik von Fremdstoffen beeinflussen (ITC 2010, NAGY et al. 2016, CHEDIK et al. 2018). An der Blut-Milch-Schranke kann der ABCG2-Transporter die Fremdstoffsekretion in die Milch verändern (JONKER et al. 2005, JANI et al. 2014). Dies kann unterschiedliche Auswirkungen zur Folge haben.

Durch den Efflux potentiell schädlicher Fremdstoffe erfüllt der ABCG2-Transporter in der Regel an physiologischen Barrieren eine schützende Funktion (s. 2.2.6, LESLIE et al. 2005). An der Blut-Milch-Schranke hingegen, führt der Carrier zwar zum Schutz des Muttertieres, ermöglicht aber eine Anreicherung potentiell gefährlicher Fremdstoffe in der Milch (LESLIE et al. 2005, VAN HERWAARDEN und SCHINKEL 2006, JANI et al. 2014). Eine Anreicherung der Milch mit z. B. Veterinärarzneimitteln oder Pestiziden kann sowohl eine Gefahr für Neonaten als auch für den Verbraucher darstellen (VAN HERWAARDEN und SCHINKEL 2006). Bisher gibt es kaum Daten, ob aus den Futtermitteln aufgenommene Pflanzenschutzmittel bABCG2-vermittelt aktiv in die Milch sezerniert werden können.

Die aktive Sekretion von Fremdstoffen über den ABCG2-Transporter in die Milch könnte nach VAN HERWAARDEN und SCHINKEL (2006) auch pharmakotherapeutisch genutzt werden. So könnte beispielsweise eine systemische Behandlung der Mutter mit Acyclovir dazu führen, dass sich das Virostatikum als ABCG2-Substrat aktiv in der Milch anreichert und die Kontagiosität von in der Milch vorhandenen Viren, wie z. B. dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), reduziert. Dadurch könnte die Infektionsgefahr für die säugenden Nachkommen verringert werden. Für die Veterinärmedizin wäre eine parenterale Anwendung von ABCG2-Substraten zur Mastitistherapie denkbar (SCHRICKX und FINK-GREMMELS 2008).

Interessanterweise zeigt der ABCG2-Transporter auch einen wesentlichen Einfluss auf die Milchleistung und den Milchfett- sowie Milchproteingehalt (COHEN-ZINDER et al. 2005).

Wie bereits erwähnt, beeinflusst der ABCG2-Transporter die Pharmakokinetik von Arzneimitteln (ITC 2010, NAGY et al. 2016). Dabei spielen Wechselwirkungen verschiedener Stoffe am bovinen ABCG2-Effluxtransporter eine entscheidende Rolle. So konnte eine veränderte Transportrate des ABCG2-Substrates Monepantelsulfon unter Einfluss von Enrofloxacin und Oxfendazol beobachtet werden (MAHNKE et al. 2016). Außerdem konnte eine Veränderung des Transportes von Nitrofurantoin durch diätetische Isoflavone für das Schaf bereits belegt werden (PEREZ et al. 2009b, MERINO et al. 2010). Inwiefern verschiedene Pestizide mit dem bovinen ABCG2-Transporter wechselwirken, ist bislang unklar.

2.4 Pestizide

2.4.1 Überblick

„Pestizide sind Substanzen, die zur Tötung, Vertreibung und Hemmung des Wachstums oder der Vermehrung von lästigen oder schädlichen Lebewesen eingesetzt werden.“ (POTSCHKA et al. 2015). Dabei umfasst der Begriff „Pestizide“ sowohl Biozide, als auch Pflanzenschutzmittel (VO (EG) 1185/2009, COM 2016). Während Pflanzenschutzmittel dem Schutz von Pflanzen vor dem Befall mit Schädlebewesen oder Krankheiten dienen (COM 2008, VO (EG) 1107/2009), werden Biozide angewendet, um den Menschen oder Produkte der Menschen vor Schädlingen zu schützen, z. B. Rattengift zum Vorratsschutz (VO (EU) 528/2012). Die Unterteilung von Pestiziden in z. B. Herbizide, Fungizide, Insektizide, Akarizide, Nematizide, Molluskizide, Rodentizide, Wachstumsregulatoren und Repellentien erfolgt nach dem Zielorganismus, der geschädigt wird, bzw. dem Wirkungsprinzip. Einige Wirkstoffe können dabei sowohl den Pflanzenschutzmitteln als auch den Bioziden (Hauptgruppe 3 nach VO (EG) 528/2012) zugeordnet werden (NIEMANN 2014). Dies gilt beispielsweise für das Fungizid Tebuconazol, das als Pflanzenschutzmittel und als Holzschutzmittel (Biozid) eingesetzt wird. In dieser Arbeit werden die ausgewählten Pestizide vorrangig in ihrer Funktion als Pflanzenschutzmittel betrachtet.

2.4.2 Einsatz von Pflanzenschutzmitteln

Gemäß § 64 PflSchG 2012 werden vom Bundesministerium für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) die jährlich abgegebenen Mengen von Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffe erfasst und gemäß der VO (EG) 1185/2009 an die europäische Kommission übermittelt. Aus dieser Meldung geht hervor, dass von den ca. 32 000 t Pestizid-Wirkstoffen pro Jahr (s. Abb. 6) in der Bundesrepublik Deutschland am häufigsten Herbizide (46,6 %) und Fungizide (37,7 %) abgegeben werden (BVL 2017a).

Der Einsatz von Herbiziden und Wachstumsregulatoren richtet sich hauptsächlich nach den Anbauverhältnissen, z. B. der Lage des Feldes oder der Bodenbeschaffenheit. Diese Gegebenheiten unterliegen i. d. R. nur wenigen Schwankungen, sodass die Menge der eingesetzten Herbizide und Wachstumsregulatoren jährlich annähernd gleich bleibt. Hingegen werden Fungizide und Insektizide je nach Witterung und Befallstärke jährlich variierend angewendet (SCHMIDT und GUTSCHE 2000).

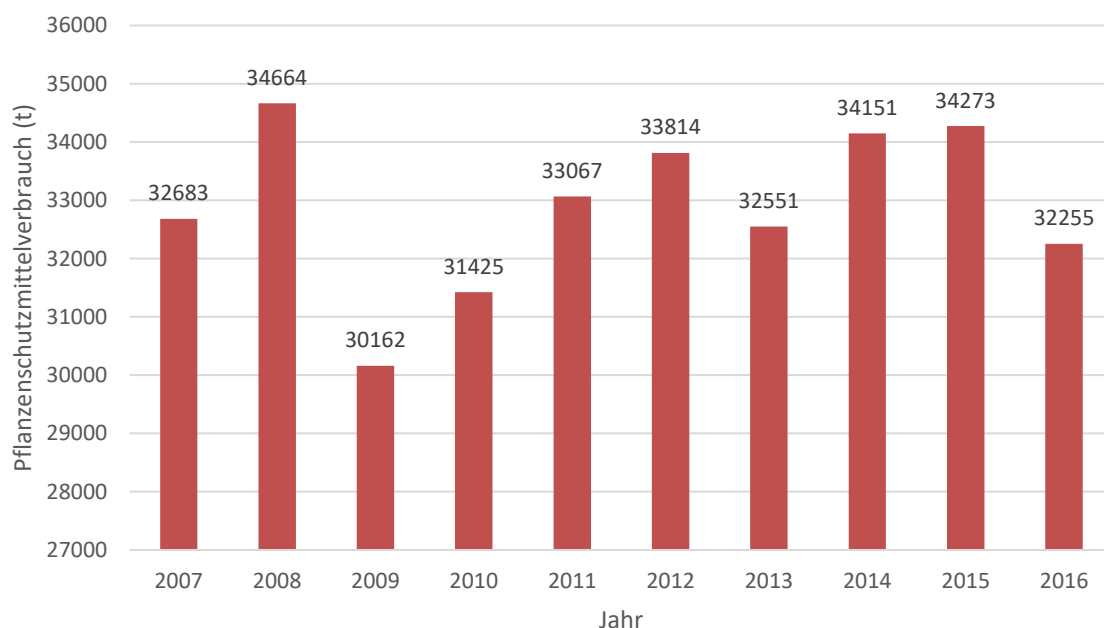


Abb. 6 Inlandsabsatz der Summe an Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffen (t) ohne inerte Gase seit 2007 (abgeleitet aus Tabelle 3.2 Inlandsabsatz an Wirkstoffen (t); Entwicklung seit 2007 (BVL 2017a)).

2.4.3 Rechtliche Regelungen

Im Rahmen des präventiven Verbraucherschutzes werden Pflanzenschutzmittel sowohl auf europäischer als auch auf nationaler Ebene reglementiert. Die Prüfung und Zulassung von Pflanzenschutzmitteln und ihren Wirkstoffen wird in der VO (EG) 1107/2009 geregelt. Es wird festgelegt, dass nur unbedenkliche Wirkstoffe und Pflanzenschutzmittel in den Verkehr

gebracht werden dürfen. Innerhalb der EU genehmigte Wirkstoffe werden in der Durchführungsverordnung DVO (EG) 540/2011 gelistet. Zur Prüfung der Unbedenklichkeit von Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffen wird in der VO (EU) 283/2013 der Umfang der toxikologischen Untersuchungen und deren Bewertung, die vom Hersteller für das Zulassungsverfahren erhoben werden müssen, festgesetzt. Darüber hinaus regelt diese Verordnung, welche toxikologischen Studien zum Nachweis der Unbedenklichkeit der Pflanzenschutzmittel erbracht werden müssen. Auf nationaler Ebene wird durch die Pflanzenschutzmittelverordnung (PflSchuMV 2013) die Genehmigung und Zulassung innerhalb Deutschlands konkretisiert. Zahlreiche weitere nationale Verordnungen legen die weitere rechtliche Grundlage für die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln (BfR 2018b, BMEL 2018).

2.4.4 MRL-Wert-Festsetzung von Pestiziden

Durch die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln können geringe Mengen dieser Substanzen auf den Pflanzen verbleiben, die als Rückstände bezeichnet werden (COM 2008, BVL 2017b). Im Rahmen des präventiven Verbraucherschutzes werden für Pestizide in pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln gesetzlich festgelegte Höchstgrenzen (MRL-Werte) definiert, die maximal toleriert werden (WHO 1997, COM 2008). Aufgrund der Verordnung der Europäischen Gemeinschaft VO (EG) 396/2005 werden MRL-Werte für alle Mitgliedstaaten der Europäischen Union (EU) harmonisiert festgelegt und für die Zulassung eines Pestizids vorausgesetzt (BVL 2017b).

Im Rahmen einer nationalen Zulassung werden gemeinsam erarbeitete Vorschläge zur MRL-Wert-Festsetzung vom antragstellenden Hersteller, dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) sowie dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) an die Europäische Aufsichtsbehörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) weitergeleitet. Bei einer internationalen Zulassung innerhalb der EU erfolgt die Antragsstellung durch den Hersteller bei der EFSA. Die EFSA legt die MRL-Werte für die Substanz in den entsprechenden Lebensmitteln fest (BMEL 2014). Diese MRL-Werte sind in der EU Pestizid Datenbank (<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>) online abrufbar (COM 2015b). Ist für einen Wirkstoff und/oder Erzeugnis kein MRL-Wert festgesetzt, gilt 0,01 mg/kg oder das Detektionslimit als Grenzwert (COM 2008, BVL 2017b). Im Rahmen der Lebensmittelüberwachung wird die Einhaltung der festgelegten MRL-Werte durch die zuständigen Landesbehörden überprüft (BVL 2016c).

2.4.5 Exposition des Verbrauchers

In der konventionellen Landwirtschaft kann die hohe Qualität und Quantität der pflanzlichen Lebensmittel und Futtermittel nur durch den breiten Einsatz von Pflanzenschutzmitteln erzeugt werden. Durch die Verwendung dieser Pflanzenschutzmittel können auf den erzeugten Produkten Rückstände verbleiben (KHANIKI 2007, TSIPLAKOU et al. 2010, PIRSAHEB et al. 2015, BfR 2015). Der Verzehr von Lebensmitteln, die Pestizidrückstände enthalten, stellt die Hauptexposition des Verbrauchers mit Pestiziden dar (HAMILTON et al. 2004, GALEA et al. 2015, PIRSAHEB et al. 2015). Die weitere Aufnahme von Pestiziden über die Einatmung kontaminierter Luft oder dermale Resorption machen dagegen nur ca. 2 % der Gesamtexposition des Menschen aus (PIRSAHEB et al. 2015).

Weiterhin können sich einige Pestizide auch in der Lebensmittelkette anreichern (KHANIKI 2007, TSIPLAKOU et al. 2010). Durch die Aufnahme von z. B. Herbiziden mit dem Futter können lebensmittelliefernde Tiere Pestizide aufnehmen, die in tierischen Lebensmitteln verbleiben (KHANIKI 2007, TSIPLAKOU et al. 2010). Problematisch ist dies insbesondere für Milch und Milchprodukte, da viele Pestizide aufgrund ihres lipophilen Charakters im Fettgewebe akkumulieren und mit der Milch ausgeschieden werden (MCEWEN und MCNAB 1997, KHANIKI 2007, DARKO und ACQUAAH 2008, TSIPLAKOU et al. 2010, PIRSAHEB et al. 2015).

Im Rahmen des Warenkorb-Monitorings konnte das BVL zeigen, dass 42 % aller Milchproben und 45 % aller Butterproben mit Pestiziden belastet sind, jedoch keine Probe die zulässigen MRL-Werte überschreitet (BVL 2015a, BVL 2016b). Dabei werden v. a. persistente Chlorkohlenwasserstoffe, wie Hexachlorbenzol (HCB) und Dichlordiphenyldichlorethen (p,p'-DDE) in 42 % sowie 25 % aller Milchproben nachgewiesen. Interessanterweise konnte im Vergleich zu den Studien aus 2010 eine Zunahme der HCB-Belastung um 5 % verzeichnet werden (BVL 2015a). Im Jahr 2015 wiesen 38 % aller Butterproben HCB und 31 % aller Butterproben p,p'-DDE-Rückstände auf (BVL 2016b). Dies verdeutlicht, dass sowohl Milch als auch Milchprodukte in Deutschland in ähnlichem Maße mit Pestizidrückständen belastet sind. Besonders interessant ist hierbei, dass HCB nach VO (EG) 850/2004 und auch DDT nach dem DDT-Gesetz (1972) seit Jahren nicht mehr als Pflanzenschutzmittel angewendet werden dürfen, aber dennoch in tierischen Lebensmitteln, wie Fleisch und Leber von Kalb oder Rind sowie Milch und Milchprodukten nachgewiesen werden (BVL 2014a, BVL 2015a, BVL 2016a, BVL 2016b).

Insbesondere für chlorkohlenwasserstoffhaltige Pestizide konnte gezeigt werden, dass sie in der Lebensmittelkette bioakkumulieren und sich in tierischen Lebensmitteln, wie der Milch, anreichern (MCEWEN und MCNAB 1997, DARKO und ACQUAAH 2008). So konnten auch zahlreiche Studien außerhalb Deutschlands Nachweise für Chlorkohlenwasserstoffe in Milchproben erbringen. Dabei lagen die meisten Werte ebenfalls unterhalb der landesspezifisch erlaubten Höchstmengen (MALLATOU et al. 1997, PARDÍO et al. 2003, PAGLIUCA et al. 2006, SHARMA et al. 2007, DARKO und ACQUAAH 2008, NAG und RAIKWAR 2008, TSAKIRIS et al. 2013, JAWAID et al. 2016, AL ANTARY et al. 2017). Wie aus einem Übersichtsartikel von PIRSAHEB et al. (2015) hervorgeht, ist auch die Milch stillender Frauen in Europa und Asien überwiegend mit Chlorkohlenwasserstoffen, wie HCB, DDT und seinen Metaboliten (p,p'-DDE, p,p'-DDD), sowie polychlorierten Biphenylen (PCB) belastet. Durch das Verbot vieler Chlorkohlenwasserstoffe scheint die Aufnahme dieser Kontaminanten vorrangig durch die Bioakkumulation in Lebensmitteln zu erfolgen, während andere Expositionswege, wie z. B. inhalative Aufnahme, unwahrscheinlicher sind. Besonders die mögliche Anreicherung von Pestiziden in der Milch birgt hierbei eine große Verbrauchergefahr, denn Milch ist ein Lebensmittel, das weltweit am häufigsten, v. a. von Kindern, konsumiert wird (GEROSA et al. 2012, BfR 2015). Eine Belastung der Milch mit Pestizidrückständen kann insbesondere bei Kindern, die im Verhältnis zu ihrem Körpergewicht sehr große Mengen konsumieren, und sich noch in der Entwicklung befinden, zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen. Bislang werden bei Einhaltung der gesetzlich festgelegten MRL-Werte Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit vom BfR als unwahrscheinlich eingeschätzt (BfR 2015).

2.4.6 Gesundheitliche Risiken

Akute Intoxikationen mit Pestiziden werden oft unbeabsichtigt durch falsche Handhabung herbeigeführt und treten häufig, aber regional unterschiedlich auf (PAN Germany 2012). Insbesondere in der westlichen Pazifikregion werden viele Suizidversuche mit Pestiziden unternommen, sodass in diesen Regionen akute Intoxikationen häufig sind (PAUDYAL 2008, PAN Germany 2012).

Akute Vergiftungen durch Rückstände von Pestiziden in Lebensmitteln sind hingegen sehr selten und treten z. B. durch unbeabsichtigte Kontaminationen von Lebensmitteln auf. In der Regel sind die enthaltenen Mengen meist zu gering, um akute Vergiftungen hervorzurufen (HAMILTON et al. 2004).

In Industrieländern erfolgt trotz der festgelegten MRL-Werte eine Beeinträchtigung der Gesundheit des Verbrauchers vorrangig durch die chronische Exposition mit Pestizidrückständen in niedrigen Konzentrationen (HAMILTON et al. 2004, PAUDYAL 2008). In einer Vielzahl von Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die chronische Exposition mit Pestiziden die Inzidenz von chronischen Erkrankungen erhöht. MOSTAFALOU und ABDOLLAHI (2013) fassten in einem Übersichtsartikel verschiedene Studien zum Einfluss von Pestiziden auf die Ausbildung chronischer Erkrankungen und mögliche Mechanismen beim Menschen zusammen. Dabei schlussfolgern die Autoren, dass insbesondere neoplastische Erkrankungen, wie z. B. Prostatakarzinom und Lungenkrebs, in einem direkten Zusammenhang mit der Exposition bestimmter Pestizide, wie z. B. Chlorpyrifos, stehen. Viele weitere neoplastische, reproduktive, neurodegenerative (Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Amyotrophe Lateralsklerose), sowie kardiovaskuläre (Hypertension, Artherosklerose), respiratorische (Asthma, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen), renalen und endokrine Erkrankungen (Diabetes) werden als mögliche Folgen einer Pestizidexposition in Betracht gezogen. Zu den Mechanismen werden zum einen genetische Veränderungen, wie direkte DNA-Schäden, und epigenetische Modifikationen gelistet. Zum anderen werden als auslösende Faktoren die Wirkung als endokrine Disruptoren, Störung der Mitochondrienfunktion, die Auslösung von oxidativem und endoplasmatischem Stress, sowie die Beeinflussung der Proteindegradation angeführt. Obwohl nicht immer ein direkter Zusammenhang zwischen Pestizidexposition und Krankheit gezeigt werden kann, besteht die Annahme, dass Pestizide einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung dieser Krankheiten leisten (MOSTAFALOU und ABDOLLAHI 2013, NTZANI et al. 2013). Mitarbeiter der EFSA überprüften 603 epidemiologische Studien seit 2006 und schlussfolgerten etwas kritischer, dass die Gefahr Parkinson oder Kinderleukämie zu entwickeln durch die Exposition gegenüber Pestiziden steigt. Jedoch fehlen für eine Korrelation zwischen Asthma, Allergien, sowie endokrine Störungen, wie Diabetes und Übergewicht, valide Studien (NTZANI et al. 2013).

Manche Pestizide rufen zwar allein keine gesundheitliche Beeinträchtigung hervor. Jedoch scheint eine multiple Pestizidexposition im Zusammenhang mit der Entstehung von endokrinen Entwicklungsstörungen zu stehen (JACOBSEN et al. 2010).

2.4.7 Pestizide als endokrine Disruptoren

Der Begriff „endokrine Disruptoren“ bezeichnet exogene Substanzen, die durch Störungen des Hormonhaushaltes zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen (EWENCE et al. 2015). Die Wirkung von Pestiziden als endokrine Disruptoren ist Gegenstand zahlreicher

Forschungsarbeiten und wird im Zulassungsverfahren von Pflanzenschutzmitteln und Bioziden berücksichtigt. Gemäß VO (EG) 1107/2009 und VO (EU) 528/2012 dürfen Pestizide nicht zugelassen werden, die auf den Hormonhaushalt einwirken. Einige Studien konnten jedoch belegen, dass zugelassene Wirkstoffe, wie beispielsweise Prochloraz, dennoch endokrin aktiv sind (VINGGAARD et al. 2006, OHLSSON et al. 2010). Endokrine Disruptoren wurden mit der Entstehung hormon-abhängiger Tumoren, sowie Fruchtbarkeitsstörungen und embryonalen Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht (KHANIKI 2007, MOSTAFALOU und ABDOLLAHI 2013).

Darüber hinaus befassten sich etliche Studien mit der Auswirkung von Pestizidkombinationen auf den Hormonhaushalt (BIRKHØJ et al. 2004, JACOBSEN et al. 2010, OHLSSON et al. 2010, RIEKE et al. 2014, RIEKE et al. 2017, HEISE et al. 2018). So konnte für die Fungizide Prochloraz, Ketoconazol und Imazalil, sowohl einzeln als auch in Kombination, eine Hemmung der Kortisolsekretion und eine biphasische Beeinflussung der Aldosteronsekretion im Zellmodell beobachtet werden (OHLSSON et al. 2010). RIEKE et al. (2014) konnten durch *In-vitro*-Studien additive Effekte auf die Hormonsynthese bei kombinierter Inkubation mit drei Pestiziden gegenüber der Einzelinkubation in placentaren JEG-3 Zellen aufzeigen. Die Autoren identifizierten für Prochloraz und Chlorpyrifos eine durch AhR veränderte Expression der CYP1A1-Enzyme als mögliche Ursache. Eine Exposition von Ratten mit einer Kombination von Triazol-Fungiziden unterhalb der NOEL-Konzentration (No Observed Effect Level) führte zu einer verlängerten Trächtigkeit und zu Entwicklungsstörungen der Föten, während dieser Effekt für die einzelnen Wirkstoffe nicht beobachtet werden konnte (JACOBSEN et al. 2010). Die Studie von HEISE et al. (2018) konnte *In-vivo* eine verstärkte Induktion verschiedener CYP-Enzyme, ABC-Transporter und Enzyme des Fettsäurestoffwechsels bei Exposition gegenüber einer Pestizidmischung unterhalb der NOEL-Werte im Vergleich zu den einzelnen Wirkstoffen zeigen.

2.4.8 Mehrfachrückstände

Viele Lebensmittel sind gleichzeitig mit mehreren Pestizidrückständen belastet, diese werden als Mehrfachrückstände bezeichnet (BVL 2005, BfR 2015). Im Monitoring 2016 wurde für 37,5 % aller untersuchten Lebensmittelprouben mehr als ein Pestizidwirkstoff in quantifizierbarer Menge nachgewiesen (BVL 2018a). Milchproben, die zuletzt 2013 untersucht wurden, wiesen zu 26 % Mehrfachrückstände auf und damit 6 % mehr als in der vorherigen Beproubung im Jahr 2010 (BVL 2015a). Am häufigsten werden jedoch Belastungen mit mehreren Wirkstoffen bei pflanzlichen Lebensmitteln detektiert (BVL 2018a). Als Ursachen

für den Anstieg dieser Mehrfachbelastung werden zum einen die sensitivere Analytik, die den Nachweis von sehr geringen Rückstandskonzentrationen ermöglicht, und zum anderen die zunehmende kombinierte Anwendung von Pestiziden angeführt (BfR 2015). Früher fanden häufiger Breitbandprodukte Anwendung, die aufgrund ihrer zahlreichen Nebenwirkungen oder einer schlechten Resistenzlage heutzutage seltener ausgebracht werden. Die kombinierte Anwendung von Pflanzenschutzmitteln bringt den Vorteil der selektiven Abwehr von Schaderregern, sowie der Verminderung von Resistenzen (BVL 2005, BfR 2015).

2.4.9 Risikobewertung von Mehrfachrückständen

Bei der Beprobung von Lebensmitteln sind häufig nur sehr geringe Konzentrationen mehrerer Pestizidrückstände nachweisbar und meist überwiegt ein Wirkstoff als Hauptkontaminant, deswegen schätzte das BfR mögliche Gefahren von Mehrfachrückständen als vernachlässigbar ein (BfR 2015). Studien, wie von OHLSSON et al. (2010) zeigten, dass die Inkubation mit einzelnen Imidazolen (Prochloraz, Ketoconazol, Imazalil) im Vergleich zu deren Kombinationen unterschiedliche Effekte auf das Hormonsystem haben kann. Darüber hinaus schlussfolgerten die Autoren, dass die Auswirkungen der Imidazole nur teilweise mit den bisherigen Vorhersagemodellen belegt werden konnten. Wissenschaftliche Erkenntnisse über mögliche synergistische, additive oder antagonistische Effekte von Wirkstoffkombinationen führten zu einem Umdenken. Die EFSA und das BfR entwickeln derzeit neue Konzepte, um eine kumulative Risikobewertung von Mehrfachrückständen zu ermöglichen. Das BfR ermittelt einen Gefahrenindex (Hazard Index) einer Wirkstoffkombination, der sich aus der Addition der Quotienten aus Exposition und toxikologischem Grenzwert der einzelnen Wirkstoffe errechnet. Diese Methode ermöglicht eine akute, kumulative Risikobewertung für den Anwender und den Verbraucher (BfR 2018a). Die chronische kumulative Risikobewertung erfolgt anhand der detektierten Rückstandsgehalte, die im Monitoring des BVLs ermittelt wurden und anhand des Modells der kumulativen Bewertungsgruppen (BMEL et al. 2017). Dafür werden Wirkstoffe in Gruppen (Cumulative Assessment Groups, CAG) zusammengefasst, die am gleichen Zielorgan einwirken. Bislang erfolgte diese Einteilung nur für das Nervensystem und die Schilddrüse (PPR 2013, BMEL et al. 2017). Die erstmalig vorgenommene Bewertung zeigte, dass eine Beeinträchtigung der Gesundheit durch kumulative Effekte auf neurochemische Vorgänge oder auf das Thyroid-Hormonsystem möglich ist. Dabei konnte insbesondere eine Verbraucherexposition gegenüber Chlorpyrifos und Dithiocarbamaten als Hauptursache identifiziert werden. Weitere kumulative Risikobewertungen sind jedoch bislang nicht erfolgt und befinden sich noch in der Entwicklung (BMEL et al. 2017).

Die große Vielzahl möglicher Kombinationen von Chemikalien, die wechselwirken könnten, erschwert die routinemäßige Analyse von Pestizidgemischen (RIEKE et al. 2014). Zur Identifikation und Reglementierung möglicher endokriner Substanzen sollen weitere Wirkstoffe getestet werden, um eine verbesserte Risikoabschätzung zu ermöglichen (MARX-STOELTING et al. 2014). Die EFSA plant in Kooperation mit der ECHA eine Leitlinie zu veröffentlichen, wie künftig die harmonisierte Identifikation möglicher endokriner Disruptoren erfolgen soll (ECHA und EFSA 2018).

Bislang gibt es für Pflanzenschutzmittel keine gesetzlich geforderten Untersuchungen zu Wechselwirkungen mit Fremdstofftransportern, wie ABCG2 oder MDR1, wie es seitens der EMA (European Medicine Agency) für die Zulassung neuer Arzneimittel gefordert wird (EMA und CHMP 2012, EMA und CHMP 2017). Bisher fehlen daher Nachweise, ob einzelne Pestizidwirkstoffe oder auch Mehrfachrückstände an Effluxtransportern wechselwirken und so zu einer veränderten Rückstandskinetik führen können.

2.5 Problemstellung und Zielsetzung

Der ABCG2-Transporter umfasst mit seinem Substratspektrum unterschiedliche Stoffgruppen und stellt für diese Fremdstoffe die Haupttransportroute in die Milch dar (JONKER et al. 2005). Milchliefernde Wiederkäuer können durch Pflanzenschutzmittelrückstände auf Futtermitteln exponiert werden und diese können sich, wie für Chlorkohlenwasserstoffe gezeigt, in Milch und Milchprodukten anreichern (MCKELLAR et al. 1976, KHANIKI 2007, TSIPLAKOU et al. 2010, PIRSAHEB et al. 2015). Diese Arbeit soll im Rahmen des präventiven Verbraucherschutzes aufklären, ob Pestizide mögliche ABCG2-Substrate darstellen. Weiterhin soll untersucht werden, inwiefern Wechselwirkungen bei Mehrfachrückständen von Pestiziden die ABCG2-Effluxaktivität beeinflussen.

Daher sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Ist der bABCG2-Transporter an der Sekretion ausgewählter Pestizide in die Milch beteiligt?
2. Beeinflussen Mehrfachrückstände die sekretorische bABCG2-Aktivität der bovinen Milchdrüse?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Pestizide

Die in den Studien verwendeten Pestizide wurden, mit Ausnahme von Methiocarb, von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) im höchsten verfügbaren Reinheitsgrad bezogen (s. Tabelle 2, S. 31). Methiocarb wurde in 99,5 %iger Reinheit von Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Deutschland) kommerziell erworben. Die Substanzen wurden mittels Präzisionswaage eingewogen. Anschließend wurden die Stocklösungen in den angegebenen Konzentrationen mit den ausgewiesenen Lösungsmitteln (Tabelle 2, S. 31) hergestellt. Aus den Stocklösungen wurden Vorverdünnungen hergestellt, welche idealerweise als 1:1000 Verdünnungen (mit Kulturmedium *v/v*) zur Inkubation der Zellen eingesetzt wurden. Stocklösungen und Vorverdünnungen wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und maximal sechs Monate verwendet.

Tabelle 2 Pestizide

	Wirkstoffgruppe	Hersteller	Charge	Reinheit [%]	Molare Masse [g/mol]	Stock [mM]	Lösungsmittel- konzentration [%]	Lösungs- mittel
Chlorpyrifos	Thiophosphorsäureester	Sigma-Aldrich	SZBD157XV	99,9	350,59	57,0	0,2	Methanol
Chlorpyrifos-methyl	Thiophosphorsäureester	Sigma-Aldrich	SZBC109XV	99,9	322,53	37,0	0,2	Methanol
Diflufenican	Carboxamid	Sigma-Aldrich	SZBC048XV	97,9	394,29	12,5	0,2	Methanol
Dimethoat	Thiophosphorsäureester	Sigma-Aldrich	SZBC243XV	99,5	229,26	22,0	0,2	Methanol
Dimethomorph	Morpholin	Sigma-Aldrich	SZB9069XV	99,0	387,86	26,0	0,2	Methanol
Glyphosat	Phosphonat	Sigma-Aldrich	SZBC164XV	99,9	169,07	50,0	0,4	MilliQ
Ioxynil	Hydroxybenzonitril	Sigma-Aldrich	SZB8114XV	99,8	370,91	54,0	0,5	Methanol
Iprodion	Dicarboximid	Sigma-Aldrich	SZBC174XV	99,5	330,17	50,0	0,1	Methanol
Methiocarb	Carbamat	Dr. Ehrenstorfer	10630	99,5	225,31	44,0	0,1	Xylol
Prochloraz	Imidazol	Sigma-Aldrich	SZBA112X	99,1	367,67	26,5	0,1	Ethanol
Rimsulfuron	Sulfonylharnstoff	Sigma-Aldrich	SZBC047XV	99,9	431,44	2,3	0,1	Ethylacetat
Tebuconazol	Triazol	Sigma-Aldrich	SZBB055XV	99,5	307,82	32,5	0,1	Toluol
Thiacloprid	Neonicotinoid	Sigma-Aldrich	SZBC180XV	99,9	252,72	23,7	0,1	Ethylacetat
Tolclofos-methyl	Thiophosphorsäureester	Sigma-Aldrich	SZBA323XV	97,9	301,13	17,0	0,1	Methanol

3.1.2 Chemikalien

DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's PBS	Biowest SAS, Nuaillé, Frankreich
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylacetat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 33342	Biochemica AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MilliQ	Anlage Millipore Synergy UV, Millipore S.A.S., Molsheim, Frankreich
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Toluol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
WST-1 Reagenz	Roche, Mannheim, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.3 Kit

BCA-Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
(Bestandteile: Bovines Serumalbumin (BSA) 2 mg/ml, Reagenz A, Reagenz B)	

3.1.4 Puffer und Lösungen

PBS

NaCl	8,00 g/L	137,0 mM
KCl	0,20 g/L	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,20 g/L	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	1,15 g/L	8,0 mM

ad 1 L Aqua bidest, pH 7,4, autoklaviert

Dulbecco's PBS w/o Kalzium, w/o Magnesium

Dulbecco's PBS 9,55 g/L

ad 1 L Milli-Q-Wasser, pH 7,4, autoklaviert

Zusammensetzung der Einzelbestandteile entspricht PBS (s.o.).

10 % SDS-Lösung

SDS	100 g/L	347,0 mM
-----	---------	----------

ad 1 L Milli-Q-Wasser

Triton-X 100

10 % (v/v) Triton-X 100 in PBS

3.1.5 Zellkultur

Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Eppendorfgefäße	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2,0 ml Eppendorfgefäße	Dr. I. Schubert, Leipzig, Deutschland
Kanülen, Spritzen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo Spritzenfilter	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
96-well-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz

Alle weiteren Einmalartikel wurden von der Firma Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) bezogen.

MDCKII-Zellen

Die für die Studien verwendeten MDCKII-bABCG2- (Acc. No. mRNA EU570105, Acc. No. Protein ACB47220) und MDCKII-Mock-Zellen wurden im Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie von Frau Dr. Wassermann generiert (WASSERMANN et al. 2013b). Die MDCKII-Zellen (Madin Darby Canine Kidney II) entstammen dem caninen, proximalen Nierentubulus und wurden mit dem bovinen ABCG2-Transporter, der aus laktierenden Rindereutern isoliert wurde, stabil transfiziert (MDCKII-bABCG2). Die MDCKII-bABCG2-Zellen beinhalten neben der ABCG2-Gensequenz 96 Basenpaare des regulatorischen 5'UTR-Bereiches. Als Kontrolle dienende MDCKII-Mock-Zellen beinhalten eine inverse Variante (3'-5'-Orientierung der cDNA) des caprinen ABCG2-Transporters (Acc. No. mRNA GQ241418, Acc. No. Protein ACS91462).

Medium und Zusätze

MEM Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
mit Earle's Salzen, 2,2 g/L NaHCO ₃	
und stabilem Glutamin	
Gibco FCS	Life Technology, Darmstadt, Deutschland
Pen/Strep	Biochrom, Berlin, Deutschland
NEA	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland

3.1.6 Geräte

Software

SigmaPlot 11.0	Systat Software, San Jose, CA, USA
Microsoft Office 2000 (Excel, Word)	Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA

Spektralphotometer

Die Photometer für die Absorptionsmessungen (TecanSpectra Thermo Rainbow, Tecan Sunrise) sowie die Fluoreszenzphotometer (Tecan Genios Reader) wurden von der Firma Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim, Deutschland) hergestellt.

Zentrifugen

Kühlzentrifuge 5403, Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
---	---------------------------------

Weitere Geräte

Autoklav 3870 ELV	Systec, Wettengel, Deutschland
Autoklav Laboklav 55 B	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
pH-Meter 761	Calimatic Knick, München, Deutschland
Plattformschüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach Deutschland
Präzisionswaage MC BA 100	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spülmaschine Mielabor G7783 Multitronic	Miele, Berlin, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Super 10P	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wärmeschrank Memmert	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad Lauda M12	Lauda Dr. R. Wobser GmbH Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine zellbiologische Methoden

Die zellbiologischen Studien wurden nach aktuell gültigem Gentechnikgesetz (GenTG), unter S1-Bedingungen, durchgeführt (Aktenzeichen des Genehmigungsbescheides für die S1-Anlage: 56-8811.71/122).

3.2.1.1 Kultivierung

Von WASSERMANN et al. (2013b) generierte MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen wurden mit FCS (10 %, v/v), NEA (1 %, v/v) und Pen/Strep (1 %, v/v) supplementiertem MEM Medium (10 ml) in T75-Flaschen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Zellwachstum und Zellmorphologie wurden regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft. Die Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II mit laminarer Strömung und verwendete Materialien sowie Reagenzien wurden, wie in 3.1 angegeben, zuvor autoklaviert.

3.2.1.2 Passagieren

Die in T75-Flaschen kultivierten MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen wurden nach Literaturvorgabe (WASSERMANN et al. 2013b) alle 3 – 4 Tage bei subkonfluentem Monolayer (80 – 90 %) passagiert. Vorab wurde das alte Medium abgesaugt und die anhaftenden Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die Flaschenbodenoberfläche mit 1 ml Trypsin/EDTA benetzt und die Zellen für 15 – 20 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Nachfolgend wurde die Trypsinierung der Zellen mit 10 ml 37 °C warmen Medium gestoppt und die durch Trypsin abgelösten Zellen resuspendiert. Nachfolgend wurden 0,5 – 1 ml der Zellsuspension in eine neue T75-Flasche mit 10 ml vorgelegtem, warmem Medium überführt, geschwenkt und als neue Passage definiert. Um stabile Zelleigenschaften zu gewährleisten, wurden die Zellen für maximal 6 – 8 Wochen in Kultur gehalten.

3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die standardisierte Aussaat der MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen in Kulturplatten wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1 mm) bestimmt. Die Zählkammer wurde mit einem Deckgläschen versehen, dessen korrekter Sitz durch das Erscheinen Newton'scher Ringe gekennzeichnet war. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde seitlich in die Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden unter dem Lichtmikroskop vier

Quadrate ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde der Mittelwert mit 10^4 Z/ml multipliziert.

3.2.1.4 Kryokonservierung

Zu Beginn der Studien wurde von vorhandenen MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen eine Kryobank angelegt, um in den Versuchen mit vergleichbaren Passagen arbeiten zu können. Zur Kryokonservierung wurde MEM-Medium mit 10 % FCS (v/v) sowie 10 % DMSO (v/v) versetzt und danach sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Von MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen wurden durch Trypsinieren (3.2.1.2) Zellsuspensionen gewonnen und jeweils die Zellzahl (3.2.1.3) bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden für 5 min zentrifugiert (Kühlzentrifuge 5403, 4 °C, 2000 rpm), der Überstand abgesaugt und nach mechanischer Lockerung der Zellpellets wurde zum Einstellen des Zellgehaltes (4×10^6 Z/ml) jeweils die errechnete Menge Kryomedium ergänzt. Die Überführung in gekühlte Kryoröhrchen erfolgte unmittelbar. Die kryokonservierten Zellpellets wurden für mindestens drei Tage bei -80°C tiefgefroren und zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur erneuten Kultivierung wurden die Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Zellen wurden zügig in eine T75-Flasche mit 20 ml vorgelegtem kaltem Medium überführt und resuspendiert. Nach 24 h Kultivierung im Brutschrank (37°C , 5 % CO_2) wurde das Medium gewechselt und nach Erreichen eines Konfluenzgrades von 90 % wurden die Zellen erstmalig passagiert. Eine Zellaussaat wurde erst zur zweiten Passage vorgenommen.

3.2.2 Bestimmung der Zellvitalität mittels WST-1 Zytotoxizitätstest

Die Bestimmung der Zytotoxizität der ausgewählten Pflanzenschutzmittel erfolgte anhand des WST-1 (Water Soluble Tetrazolium) Zytotoxizitätstests. Das Prinzip dieses Assays basiert auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes zu wasserlöslichem, dunkelroten Formazan durch zelluläre Enzyme (s. Abb. 7). Umso vitaler die vorhandenen Zellen sind, desto höher ist deren mitochondriale Dehydroxylase-Aktivität, die wiederum zu einer Zunahme der gemessenen Formazanmenge führt. Die gemessene Formazanmenge korreliert dabei direkt mit der Menge metabolisch aktiver Zellen (RODE 2008, ADAN et al. 2016).

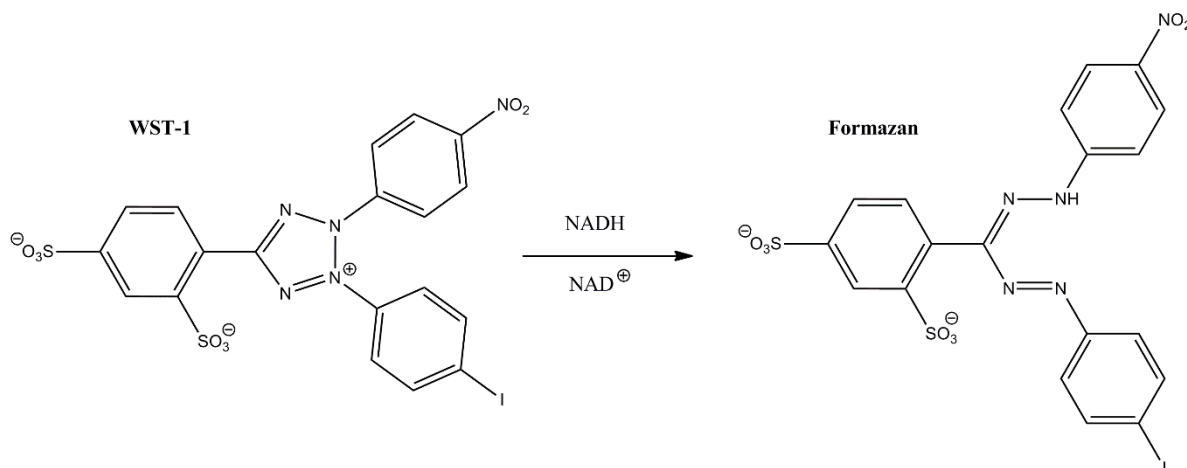


Abb. 7 Prinzip der WST-1 Reduktion (RODE 2008).

MDCKII-bABCG2-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 3×10^4 Z/ml in 96-well-Platten ausgesät und nach 24 h mit 1-, 5-, 10-, 50-, 100- und 500-facher MRL-Konzentration der ausgewählten Pestizide (s. Tabelle 3, S. 45) für 72 h vorbehandelt. Ioxynil und Rimsulfuron konnten nur mit 200-fachen MRL-Gehalt als höchste Konzentration inkubiert werden, um einen maximalen Lösungsmittelanteil von 1 % (v/v) in der WST-1 Messung nicht zu überschreiten. Für Tebuconazol konnte nur eine 100-fache MRL-Konzentration eingesetzt werden, da sich Lösungsmittelkonzentrationen über 0,2 % Toluol als zytotoxisch für die Zellen erwiesen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen und für die Positivkontrolle mit 100 %iger Toxizität erfolgte eine Inkubation mit 0,1 % (v/v) Triton X-100. Weiterhin wurden Lösungsmittelkontrollen in höchster und niedrigster Lösungsmittelkonzentration berücksichtigt. Nach 72-stündiger Inkubation, wurde der konfluente Zellmonolayer zweimal mit 200 µl/well 37 °C warmem PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl/well WST-1 Reagenz (5 %, v/v, in Kulturmedium) für 60 min (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Die Absorption der gebildeten Formazanmenge wurde bei 450 nm mittels Spektralphotometer (Tecan Spectra Thermo Rainbow) für die Zeitpunkte $t = 0$ min und $t = 60$ min gemessen. Die Zellvitalität wurde als Differenz der Messzeitpunkte ($t_{60\text{min}} - t_{0\text{min}}$) abzüglich der Hintergrundabsorption in Relation zur unbehandelten Kontrolle berechnet. Die daraus ermittelten, pestizidspezifischen IC₅₀-Werte sind definiert als die Konzentration, die eine 50 %ige Reduktion der Formazanabsorption bewirkt. Die gebildete Formazanmenge ist direkt proportional zur Zellvitalität und der IC₅₀-Wert stellt somit die Pestizidkonzentration dar, welche die Vitalität um 50 % reduziert. Die grafische Darstellung der sigmoidalen Kurve wurde durch einen 4-parametrischen Test im Kurvenverlauf angepasst.

3.2.3 Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Im Anschluss an den Hoechst-Assay (s. 3.2.4 und 3.2.5) erfolgte die quantitative Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay). MDCKII-Zellen wurden mit 1 %iger (v/v) SDS-Lösung lysiert und anschließend über Nacht bei -20°C eingefroren. Nachfolgend wurden 25 μl des aufgetauten Zelllysates zur Doppelbestimmung in eine 96-well-Platte überführt, 200 μl /well der BCA-Arbeitsreagenz (A : B = 50 : 1, Herstellung nach Herstellerangabe) hinzugefügt und für 30 min im Brutschrank (37°C , 5 % CO_2) inkubiert. Infolge der proteinbedingten Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen im alkalischen Milieu, bilden Cu^{+} -Ionen mit zwei BCA-Molekülen einen wasserlöslichen, violetten Chelatkomplex (Biuret-Reaktion), dessen Absorption im Spektralphotometer (Tecan Sunrise, 562 nm) für die Zeitpunkte $t = 0$ min und $t = 30$ min detektiert wurde. Eine Zunahme der Absorption verhält sich proportional zum Proteingehalt der Probe und kann anhand einer Standardreihe quantifiziert werden (SMITH et al. 1985). Zur Ermittlung der Kalibrationskurve wurden BSA-Verdünnungen (1 %, v/v, SDS in PBS) in absteigender Konzentration als Triplikate in die 96-well-Platte pipettiert und gemessen.

3.2.4 Ermittlung von Interaktionen am bABCG2-Transporter

Der indirekte Hoechst 33342-Akkumulationsassay wird angewendet, um Interaktionen mit dem ABCG2-Transporter zu detektieren und so potentielle Substrate des bovinen ABCG2-Transporter zu identifizieren (SCHARENBERG et al. 2002). Diese Hochdurchsatzmethode wurde zuvor von Frau Dr. Wassermann am MDCKII-bABCG2-Zellmodell etabliert (WASSERMANN et al. 2013b). In den vorstellten Studien wurden MDCKII-bABCG2- sowie MDCKII-Mock-Zellen über 4 h mit den einzelnen Pestiziden oder Pestizidkombinationen inkubiert und anschließend die Farbstoffanreicherung über 15 min bestimmt. Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (H33342) diffundiert passiv in die Zelle (s. Abb. 8 A) und wird aktiv durch den ABCG2-Effluxtransporter aus der Zelle transportiert (s. Abb. 8 B). Eine Interaktion der Pestizide mit dem bovinen ABCG2-Transporter resultiert in einer Zunahme der intrazellulären Hoechst 33342-Gehalte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (SCHARENBERG et al. 2002, HEGEDUS et al. 2009).

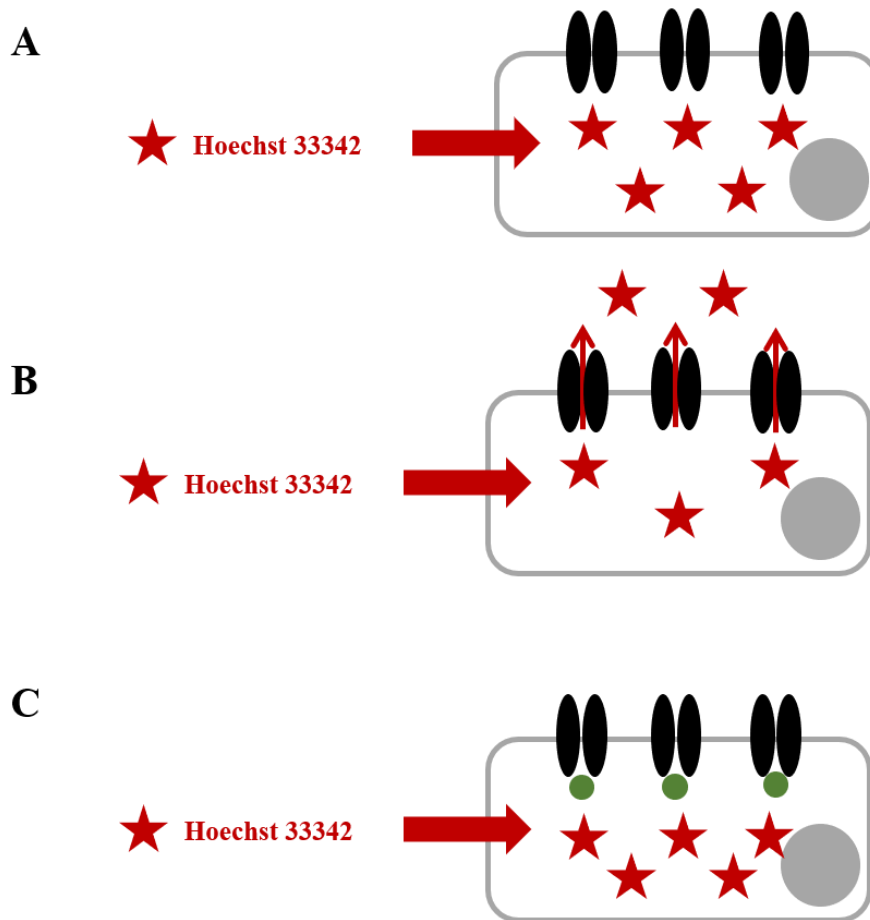


Abb. 8 Schematische Darstellung des Hoechst 33342-Akkumulationsassays. **A.** Der Fluoreszenzfarbstoff H33342 diffundiert passiv in die Zelle. **B.** Das Markersubstrat H33342 wird aktiv aus der Zelle transportiert. **C.** Infolge einer Interaktion eines Pestizids mit dem bABCG2-Transporter kommt es zur intrazellulären Farbstoffanreicherung. (schwarz: ABCG2-Transporter, grün: mit ABCG2-interagierendes Pestizid, rot: Hoechst 33342, grau: Zellmembran und Zellkern)

3.2.4.1 Aussaat und Vorbehandlung

Um am Versuchstag einen subkonfluenten Monolayer (> 95 %) zu gewährleisten, wurden MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen in einer Zelldichte von 3×10^4 Z/ml und 4×10^4 Z/ml in 96-well-Platten ausgesät. Nach einer Kultivierungszeit von 72 h wurden die Zellen mit 0,1-, 1- und 10-facher MRL-Konzentration der Pestizide (s. Tabelle 3, S. 45) für 4 h vorbehandelt (s. Abb. 9 Reihen 4 – 6 und 9 – 11). Als Kontrollen dienten MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen, die im Rahmen der Vorbehandlung ausschließlich Kulturmedium erhielten (s. Abb. 9 Reihen 2, 3, 7 und 8).

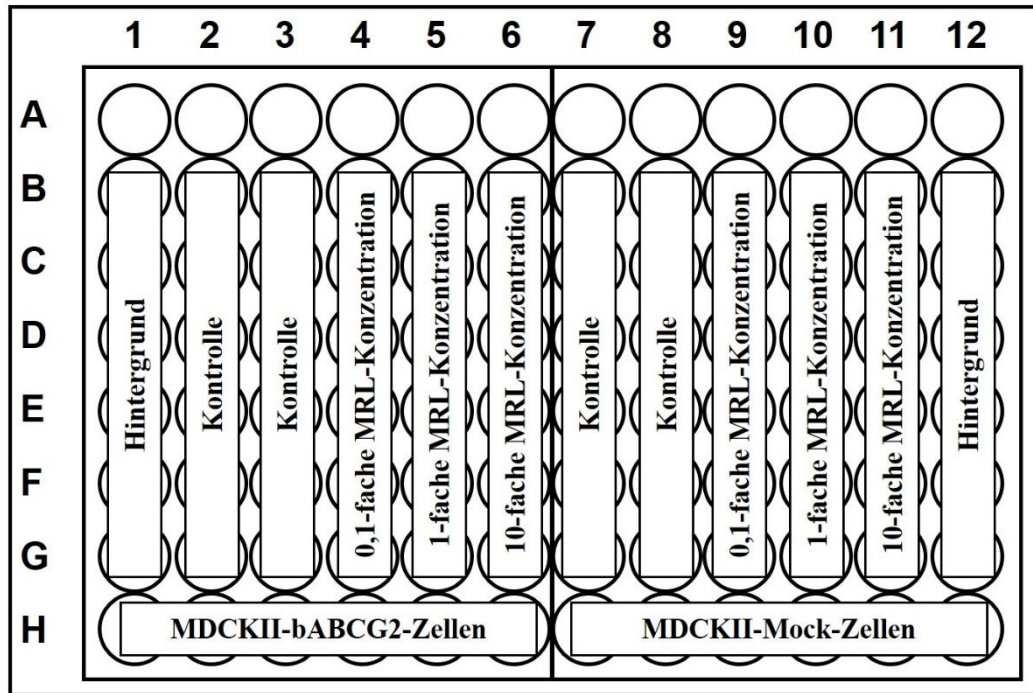


Abb. 9 Plattenlayout zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Interaktion von Pestiziden mit dem bovinen ABCG2-Transporter. In den Reihen 1 – 6 wurden MDCKII-bABCG2-Zellen und in den Reihen 7 – 12 MDCKII-Mock-Zellen ausgesät und nach 72 h mit 0,1-, 1- oder 10-facher MRL-Konzentration des jeweiligen Pestizids für 4 h vorbehandelt. Kontrollen und Hintergrund blieben unbehandelt.

3.2.4.2 Durchführung des Hoechst 33342-Assays

Nach der vierstündigen Inkubation mit den Pestiziden in 0,1-, 1- und 10-facher MRL-Konzentration wurde der subkonfluente Monolayer mit Hoechst 33342 (20 μ M) in An- oder Abwesenheit der Pestizide für 5 min und 20 min (Schüttler 150 rpm, 37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS zweimal gewaschen und mit 1 %iger SDS-Lösung (v/v, SDS in PBS) lysiert. Unmittelbar nach der Lyse der Zellen wurde mittels Fluoreszenzspektrometer (Tecan Genios, Anregung 360 nm/Emission 465 nm) die intrazelluläre Hoechst-Akkumulation in An- und Abwesenheit des ABCG2-Markersubstrates Hoechst 33342 gemessen. Die relative zelluläre H33342-Akkumulation über 15 min wurde als Differenz der Hintergrund-korrigierten Messzeitpunkte ($t_{20\text{min}} - t_{5\text{min}}$) in Relative Fluorescence Units (RFU) pro mg Protein berechnet (s. nachstehende Formeln). Um unspezifische Transportmechanismen auszuschließen, wurde die Farbstoffakkumulation in RFU der MDCKII-bABCG2-Zellen in Relation zur MDCKII-Mock-Zelllinie ohne bABCG2-Überexpression bestimmt (s. nachstehende Formel). Die Ermittlung der Proteingehalte erfolgte über den BCA-Assay (s. 3.2.3). Die Normalisierung erfolgte auf Kontrollniveau und den Berechnungen liegen folgende Formeln zu Grunde:

$$\text{bABCG2}_{15 \text{ min}} = \frac{(t_{20 \text{ min}} - t_{5 \text{ min}})\text{RFU}}{240 \text{ min} \times \text{Proteingehalt} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}$$

$$\text{Mock}_{15 \text{ min}} = \frac{(t_{20 \text{ min}} - t_{5 \text{ min}})\text{RFU}}{240 \text{ min} \times \text{Proteingehalt} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}$$

$$\text{relative H33342-Akkumulation} = \frac{\text{bABCG2}_{15 \text{ min}}}{\text{Mock}_{15 \text{ min}}}$$

$\text{bABCG2}_{15 \text{ min}}$	Hoechst-Akkumulation über 15 min in MDCKII-bABCG2-Zellen
$\text{Mock}_{15 \text{ min}}$	Hoechst-Akkumulation über 15 min in MDCKII-Mock-Zellen
$t_{20 \text{ min}}$	Hintergrund-korrigierte intrazelluläre Hoechst-Absorption nach 20 min
$t_{5 \text{ min}}$	Hintergrund-korrigierte intrazelluläre Hoechst-Absorption nach 5 min

3.2.5 Detektion von Pestizidwechselwirkungen am bABCG2-Transporter

MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen wurden, wie in 3.2.4.1 beschrieben, in 96-well-Platten ausgesät (3×10^4 Z/ml, 4×10^4 Z/ml). Nach 72 h wurde der subkonfluente Monolayer für 4 h mit der 1-fachen MRL-Konzentration der ausgewählten Pestizidkombinationen (s. Tabelle 4, S. 47) inkubiert (s. Abb. 10 Reihen 6 und 11). Für die Pestizidkombination von Glyphosat und Rimsulfuron erfolgte zusätzlich eine Inkubation mit 10-facher MRL-Konzentration beider Herbizide. Als Kontrollen dienten native MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen (s. Abb. 10 Reihen 2 – 3 und 7 – 8). Weiterhin wurden beide Zelllinien mit den einzelnen Pestiziden in 1-facher MRL-Konzentration für 4 h vorbehandelt, um die Hoechst-Akkumulation mit der Pestizidkombination zu vergleichen (s. Abb. 10 Reihen 4 – 5 und 9 – 10).

Im Anschluss an die vierstündige Inkubation mit den einzelnen Pestiziden und den Pestizidkombinationen wurde der Hoechst-Akkumulationsassay, wie in 3.2.4.2 beschrieben, durchgeführt. Es wurde ebenfalls die relative Hoechst-Akkumulation der MDCKII-bABCG2-Zellen in Relation zum Proteingehalt und den nicht-überexprimierenden MDCKII-Mock-Zellen bestimmt.

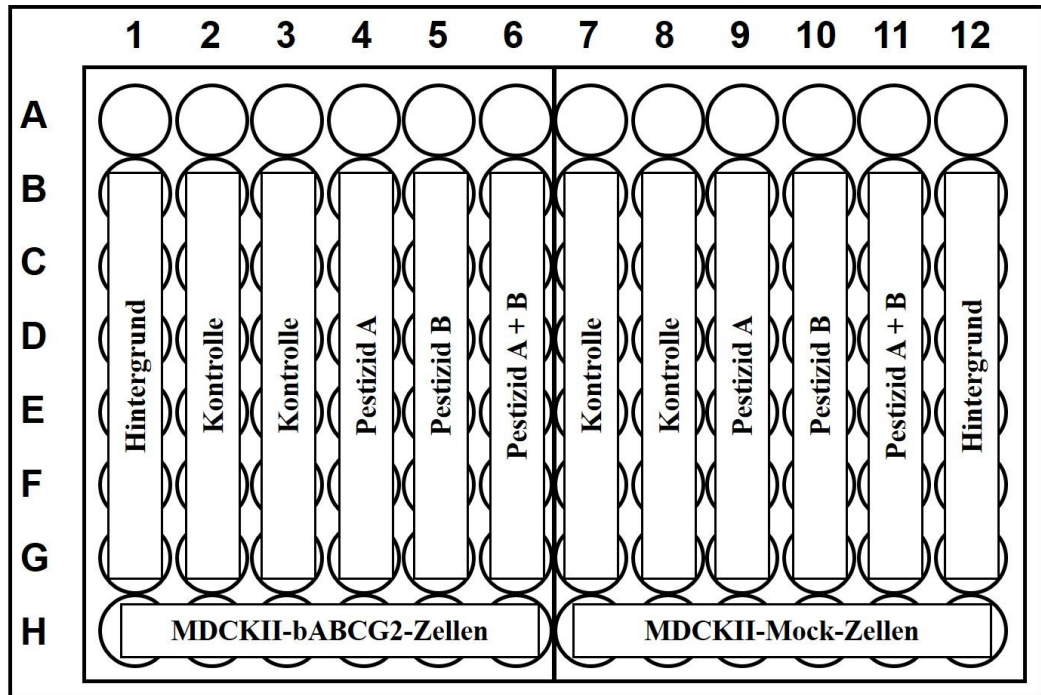


Abb. 10 Plattenlayout zur Bestimmung der Wechselwirkungen von Pestiziden am bovinen ABCG2-Transporter. In den Reihen 1 – 6 wurden MDCKII-bABCG2-Zellen sowie in den Reihen 7 – 12 MDCKII-Mock-Zellen ausgesät und nach 72 h mit 1-facher MRL-Konzentration der einzelnen Pestizide (hier: Pestizid A, Pestizid B) oder der Kombination der beiden Pestizide (Pestizid A + Pestizid B) für 4 h vorbehandelt. Kontrollen und Hintergrund blieben unbehandelt.

3.3 Statistik

Die Auswertung der Versuche erfolgte mittels Microsoft Excel 2010 und SigmaPlot 11.0. Den errechneten Mittelwerten liegen mindestens 12 Monolayer zweier unabhängiger Versuche in unterschiedlicher Passage der Zellen zu Grunde. Generell wurden die Daten als Mittelwerte und die Streuung der Messwerte durch den Standardfehler (SEM) grafisch dargestellt. Dabei wurde der SEM als Quotient aus Standardabweichung durch die Quadratwurzel der Probenzahl (n) errechnet. Messwerte, die zu weit von der normalen Streubreite abwichen, wurden mittels Gauß-Test sowie Histogramm identifiziert und eliminiert.

Alle Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Für eine statistische Beurteilung wurde anschließend eine Einweg-Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit nachfolgendem Holm-Šidák post hoc Test durchgeführt. Dabei wurden die Varianzen der vorbehandelten Gruppen für vierstündige Inkubation mit den Kontrollen verglichen und auf signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$) überprüft. Zur Detektion von Pestizidwechselwirkungen (s. 3.2.5) wurde zusätzlich die kombinierte Applikation der Pestizide mit der Einzelpestizidinkubation verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl der Pestizide und ihrer Konzentrationen

Die zu untersuchenden Pestizide (s. Tabelle 2, S. 31) wurden anhand nachfolgender Kriterien ausgewählt: Zum einem wurden Pestizide in die Studien inkludiert, die in Deutschland zugelassen sind (BVL 2013b, BVL 2014c). Dabei liefen die Zulassungen für Deutschland von Chlorpyrifos, Ioxynil und Tolclofos-methyl im Jahr 2015 aus (s. Tabelle 3, S. 45), dürfen jedoch bis zum Ende der Aufbrauchfrist verwendet werden. Außerdem sind Chlorpyrifos und Tolclofos-methyl weiterhin in anderen EU-Mitgliedsstaaten zugelassen (COM 2015a, LEWIS et al. 2016). Chlorpyrifos-methyl bildet eine Ausnahme, denn es besitzt keine Zulassung in Deutschland, der Einsatz ist aber in den Nachbarländern, wie Österreich, Italien, Frankreich, Belgien und der Tschechischen Republik erlaubt (COM 2015a, LEWIS et al. 2016). Zum anderen sollten Pestizide betrachtet werden, die im größeren Umfang in der Landwirtschaft eingesetzt werden. So wurden „Top Ten Wirkstoffe“ (SCHMIDT und GUTSCHE 2000) und Wirkstoffe, die im Warenkorb-Monitoring wiederholte MRL-Wert-Überschreitungen aufwiesen, in die Versuche einbezogen (BVL 2012, BVL 2014a, BVL 2015a, BVL 2016a). In den durchgeführten Experimenten fanden dabei sowohl Herbizide, Fungizide als auch Insektizide Berücksichtigung (s. Tabelle 3, S. 45).

Um die praktische Relevanz des in dieser Arbeit verwendeten *In-vitro*-Modells zu unterstreichen, wurden Pestizidkonzentrationen eingesetzt, die dem MRL-Bereich in essbaren Geweben (Fett oder Muskulatur) von Rindern entsprechen (s. Tabelle 3, S. 45). Mit der Wahl der 0,1- und 1-fachen MRL-Konzentration wurde eine möglichst realistische Belastung der Laktozyten mit den entsprechenden Pestiziden simuliert. Die Untersuchung der 10-fachen MRL-Gehalte diente der Detektion möglicher konzentrationsabhängiger Effekte. Die jeweiligen Konzentrationen wurden aus der Pestiziddatenbank der EU „EU Pesticides Database“ entnommen, die sowohl eine Abfrage der aktuellen und der vorherigen MRL-Werte der verschiedenen Pestizide für verschiedene Lebensmittel ermöglicht als auch einen Verweis auf die entsprechende Rechtsnorm beinhaltet (COM 2015b). Für Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Prochloraz und Rimsulfuron war zu Beginn der Studien kein MRL-Wert für Rindfleisch oder Rinderfett in der Pestiziddatenbank vorhanden, daher wurden die von der EFSA empfohlenen MRL-Werte für bovine Muskulatur bzw. Fett genutzt (EFSA 2005, EFSA 2011a, EFSA 2011c, EFSA 2012). Aufgrund seiner Lipophilie reichert sich Prochloraz im

Fettgewebe an, demnach reflektiert der MRL-Wert des Fettgewebes die *In-vivo*-Situation nur ungenügend. Um eine Konzentration zu wählen, die in der bovinen Milchdrüse auf die Zellen einwirkt, wurde für Prochloraz die Konzentration für bovine Muskulatur von 0,03 mg/kg anstelle des MRL-Wertes für Fett (0,1 mg/kg) genutzt (EFSA 2011a). Auch für Dimethoat, Diflufenican, Methiocarb sowie Dimethomorph lag zu Beginn dieser Studien (2014) kein gesetzlich festgelegter MRL-Wert vor. So wurde für Dimethoat, Diflufenican und Methiocarb, wie vom BVL empfohlen, 0,01 mg/kg als 1-facher MRL-Wert angenommen, da keine Fütterungsstudien für die MRL-Wertberechnung vorlagen (EFSA 2006, EFSA 2008b, EFSA 2013a, BVL 2017b). Die einzige bislang an Rindern durchgeführte Fütterungsstudie mit Dimethomorph erfolgte mit 0,5, 150 und 500 mg/Tier/Tag über 4 bis 5 Wochen. Diese Studie zeigte jedoch in allen essbaren Geweben Gehalte unterhalb des Detektionsbereiches. Da es die einzig verfügbare *In-vivo*-Studie zu Dimethomorph für das laktierende Rind ist, wurde das Detektionslimit (0,02 mg/kg) als 1-fache MRL-Konzentration eingesetzt (EFSA 2011b).

Tabelle 3 Übersicht über die Auswahl der Pestizide und der jeweilig eingesetzten Konzentrationen

Pestizid	Wirkstoff-Typ	Zulassung in Deutschland ¹	"Top Ten" Wirkstoffe ²	MRL-Wert- Überschreitungen ³	MRL bovine Muskulatur ^a /Fett ^b		
					[mg/kg]	[nM]	Referenz
Chlorpyrifos	Insektizid	bis 2015			0,04 ^{a,b}	114	EFSA 2012
Chlorpyrifos-methyl	Insektizid			X	0,02 ^{a,b}	62	EFSA 2011c
Diflufenican	Herbizid	X	X		0,01 ^{a,b}	25	EFSA 2008b
Dimethoat	Insektizid	X	X	X	0,01 ^{a,b}	44	EFSA 2013a
Dimethomorph	Fungizid	X		X	0,02 ^{a,b}	52	EFSA 2011b
Glyphosat	Herbizid	X	X	X	0,05 ^{a,b}	296	COM 2015b
Ioxynil	Herbizid	bis 2015	X		1,00 ^{a,b}	2 700	COM 2015b
Iprodion	Fungizid, Nematizid	X			0,10 ^{a,b}	303	COM 2015b
Methiocarb	Insektizid, Molluskizid	X			0,01 ^{a,b}	44	EFSA 2006
Prochloraz	Fungizid	X	X		0,03 ^a	80	EFSA 2011a
Rimsulfuron	Herbizid	X	X		0,05 ^{a,b}	116	EFSA 2005
Tebuconazol	Fungizid	X	X		0,10 ^{a,b}	325	COM 2015b
Thiacloprid	Insektizid, Molluskizid	X			0,05 ^{a,b}	198	COM 2015b
Tolclofos-methyl	Fungizid	bis 2015		X	0,01 ^{a,b}	33	COM 2015b

¹ (BVL 2013b, BVL 2014c), ² (SCHMIDT und GUTSCHE 2000), ³ (BVL 2012, BVL 2014a, BVL 2015a, BVL 2016a)

4.2 Auswahl der Pestizidkombinationen

Zur Untersuchung potentieller Wechselwirkungen von Mehrfachrückständen am ABCG2-Transporter, wurden verschiedene Wirkstoffkombinationen der Pestizide ausgewählt (s. Tabelle 4, S. 47). Aufgrund fehlender Daten zur Pestizidbelastung von Futtermitteln, wurden drei Kombinationen aus jeweils zwei Wirkstoffen ausgewählt, die im Warenkorb-Monitoring in Lebensmitteln häufig gemeinsam detektiert werden und demnach häufig kombiniert angewendet werden (MELUND 2012). Glyphosat und Chlorpyrifos-methyl werden dabei besonders häufig in z. B. Roggen detektiert, der u. a. als Ganzpflanzensilage an milchliefernde Rinder verfüttert wird (JEROCH et al. 1999, EFSA 2014c). Darüber hinaus wurden im Handel erhältliche kombinierte Präparate, wie Prochloraz und Tebuconazol sowie Ioxynil und Diflufenican, für die Studien ausgewählt (BVL 2014c). Des Weiteren wurde eine Pestizidkombination aus Glyphosat und Rimsulfuron betrachtet, die für die Maisproduktion empfohlen wird (KUHLMANN 2014), da die Maissilage ein Hauptfuttermittel für milchliefernde Rinder darstellt (JEROCH et al. 1999). Um eine *In-vivo*-nahe Situation zu generieren, wurde, wie in 4.1 beschrieben, jeweils die 1-fache MRL-Konzentration der Pflanzenschutzmittel (s. Tabelle 4, S. 47) angewendet.

Tabelle 4 Übersicht über die ausgewählten Pestizidkombinationen

Pestizidkombination	Wirkstoff-Typ	Auswahlkriterium	MRL bovine Muskulatur ^a /Fett ^b		Referenz
			[mg/kg]	[nM]	
Methiocarb	Insektizid, Molluskizid	Ko-Detektion im Warenkorb-Monitoring	0,01 ^{a,b}	44	MELUND 2012
Chlorpyrifos-methyl	Insektizid		0,02 ^{a,b}	62	
Glyphosat	Herbizid	Ko-Detektion im Warenkorb-Monitoring	0,05 ^{a,b}	296	EFSA 2014c
Chlorpyrifos-methyl	Insektizid		0,02 ^{a,b}	62	
Dimethomorph	Fungizid	Ko-Detektion im Warenkorb-Monitoring	0,02 ^{a,b}	52	MELUND 2012
Iprodion	Fungizid, Nematizid		0,10 ^{a,b}	303	
Prochloraz	Fungizid	handelsübliches, gebrauchsfertiges	0,03 ^a	80	BVL 2014c
Tebuconazol	Fungizid	Kombinationspräparat	0,10 ^{a,b}	325	
Ioxynil	Herbizid	handelsübliches, gebrauchsfertiges	1,00 ^{a,b}	2 700	BVL 2014c
Diflufenican	Herbizid	Kombinationspräparat	0,01 ^{a,b}	25	
Glyphosat	Herbizid	Kombinierter Einsatz in der Maisproduktion	0,05 ^{a,b}	296	KUHLMANN 2014
Rimsulfuron	Herbizid		0,05 ^{a,b}	116	

4.3 Einfluss der Pestizide auf die Zellvitalität

Eingangs wurde der Einfluss der ausgewählten Pestizide auf die Zellvitalität durch den WST-1 Zytotoxizitätstest bestimmt (3.2.2). Dazu wurden MDCKII-bABCG2-Zellen für 72 h täglich mit 1-, 10-, 50-, 100- oder 200-/500-fachen MRL-Pestizidkonzentrationen vorbehandelt und die Formazanmenge spektralphotometrisch bestimmt. Die gebildete Formazanmenge verhält sich dabei direkt proportional zu der metabolischen Aktivität der lebenden Zellen. Anschließend wurden die substanzspezifischen IC_{50} -Werte berechnet. Dabei sind die IC_{50} -Werte definiert als die Pestizidkonzentration, welche die Zellvitalität um 50 % reduziert.

In einer Reihe der 96-well-Platte befanden sich unbehandelte MDCKII-bABCG2-Zellen als Negativkontrolle, sowie eine Reihe mit 0,1 % Triton X-100 behandelte Zellen als Positivkontrolle. Während die Positivkontrolle in jeder Messung eine signifikante Abnahme der Zellvitalität auf Hintergrundniveau, z. B. $0\% \pm 0,7$ bei Ioxynil, aufwies, wurde die unbehandelte Negativkontrolle einer 100 %igen Vitalität gleich gesetzt. Mit Ioxynil-behandelte Zellen wiesen eine abnehmende Zellvitalität auf, die ab der 50-fachen MRL-Konzentration Signifikanzniveau erreichte (s. Abb. 11). Es konnte ein IC_{50} -Wert von $97,5\ \mu\text{M}$ ermittelt werden (s. Abb. 11), was der 36-fachen MRL-Konzentration von Ioxynil in essbaren Geweben von Rindern entspricht (s. Tabelle 3, S. 45).

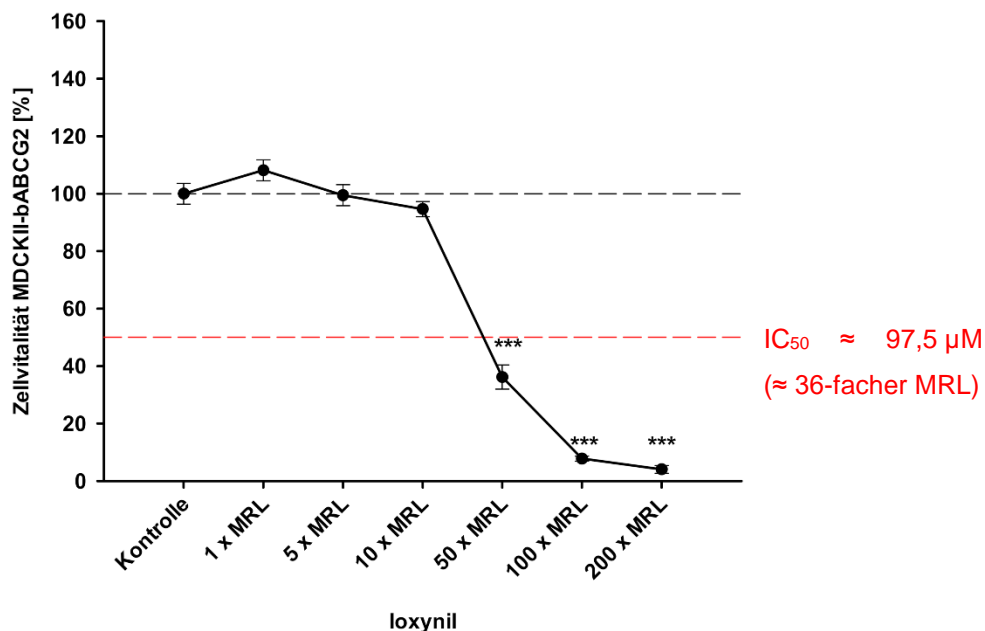


Abb. 11 Ioxynil-spezifische Zellvitalität in MDCKII-bABCG2-Zellen. MDCKII-bABCG2-Zellen wurden für 72 h mit Ioxynil in aufsteigender Konzentration sowie den Lösungsmittelkontrollen (0,25 % oder 0,5 % Methanol, nicht gezeigt) vorbehandelt. Die Zellvitalität wurde mit dem WST-1 Zytotoxizitätsassay bestimmt (3.2.2) und in Relation zur Kontrolle (100 %) berechnet. (MW \pm SEM, n = 12, One-Way-ANOVA Holm-Šidák post hoc Test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ signifikant zur unbehandelten Kontrolle)

Ergebnisse

Eine Inkubation mit Prochloraz führte in 100- und 500-facher MRL-Konzentration zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Zellvitalität (s. Abb. 12). In 500-facher MRL-Konzentration ($40\text{ }\mu\text{M}$) sank der Anteil der lebenden Zellen auf $51\% \pm 6,3$ ab. Jedoch konnte für Prochloraz in MDCKII-bABCG2-Zellen innerhalb der 1- bis 500-fachen MRL-Konzentration kein IC_{50} -Wert berechnet werden, sodass die höchste gemessene Konzentration ($40\text{ }\mu\text{M}$) näherungsweise dem IC_{50} -Wert entspricht.

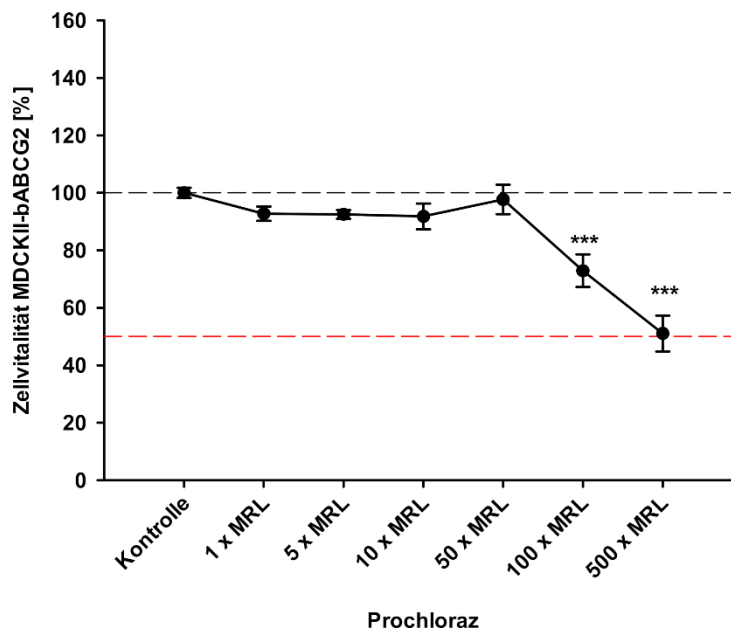


Abb. 12 Prochloraz-spezifische Zellvitalität in MDCKII-bABCG2-Zellen. MDCKII-bABCG2-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 3×10^4 Z/ml auf 96-well-Zellkulturplatten kultiviert und für 72 h mit Prochloraz in aufsteigender Konzentration sowie den Lösungsmittelkontrollen (0,1 % oder 0,5 % Ethanol, nicht gezeigt) vorbehandelt. Die Zellvitalität wurde mit dem WST-1 Zytotoxizitätsassay bestimmt (3.2.2) und in Relation zur Kontrolle (100 %) berechnet. (MW \pm SEM, n = 12, One-Way-ANOVA Holm-Šidák post hoc Test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ signifikant zur unbehandelten Kontrolle)

Bei allen weiteren getesteten Pestiziden konnte kein IC_{50} -Wert bestimmt werden, da die Zellvitalität bis zur getesteten 100- bzw. 500-fachen MRL-Konzentration jeweils über 50 % betrug (s. Abb. 13 und s. Abb. 14 im Anhang). Für Chlorpyrifos (s. Abb. 13 A), Diflufenican (s. Abb. 13 B), Glyphosat (s. Abb. 13 C) und Tolclofos-methyl (s. Abb. 14 C) konnte jeweils ab der 50-fachen MRL-Konzentration eine statistisch signifikante Abnahme der Zellvitalität beobachtet werden, die auch lichtmikroskopisch in Erscheinung trat. Dabei verursachte keine der getesteten Konzentrationen eine 50 %ige Abnahme der lebenden Zellen. Die geringste Zellvitalität konnte für die Behandlung der MDCKII-bABCG2-Zellen mit der 500-fachen MRL-Konzentration von Chlorpyrifos ($70\% \pm 1,8$, s. Abb. 13 A) und Tolclofos-methyl ($79\% \pm 6,3$, s. Abb. 14 C), mit der 100-fachen MRL-Konzentration von Glyphosat

Ergebnisse

(77 % \pm 4,5, s. Abb. 13 C), sowie mit der 50-fachen MRL-Konzentration von Diflufenican (64 % \pm 5,8, s. Abb. 13 B) detektiert werden.

Für Chlorpyrifos-methyl (s. Abb. 13 A), Methiocarb (s. Abb. 14 A), Rimsulfuron (s. Abb. 14 B), Tebuconazol (s. Abb. 14 B) und Thiocloprid (s. Abb. 14 C) konnte eine statistisch signifikante Zunahme des gebildeten Formazans über Kontrollniveau beobachtet werden. Eine Inkubation mit Chlorpyrifos-methyl und Methiocarb führte ab der 5-fachen MRL-Konzentration zu einer signifikanten Zunahme, die maximal 148 % \pm 4,3 (s. Abb. 13 A) und 134 % \pm 5,6 (s. Abb. 14 A) betrug. Rimsulfuron (s. Abb. 14 B), Tebuconazol (s. Abb. 14 B) und Thiocloprid (s. Abb. 14 C) wiesen ab der 1-fachen MRL-Konzentration eine signifikante Erhöhung der metabolischen Aktivität auf, die ab der 100-fachen MRL-Konzentration für die zuvor genannten Pestizide wieder auf 111 % \pm 4,7, 110 % \pm 4,5 und 98 % \pm 5,6 abnimmt. Für die Lösungsmittelkontrolle mit 0,1 % Toluol (Tebuconazol), sowie für sämtliche Ethylacetathaltige Kontrollen (Rimsulfuron, Thiocloprid) konnte ebenfalls eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Dimethoat (s. Abb. 13 B), Dimethomorph (s. Abb. 13 C) und Iprodion (s. Abb. 14 A), sowie die Lösungsmittelkontrollen mit Methanol oder Ethanol beeinflussten in keiner der getesteten Konzentrationen das Zellüberleben bei 72-stündiger Inkubation.

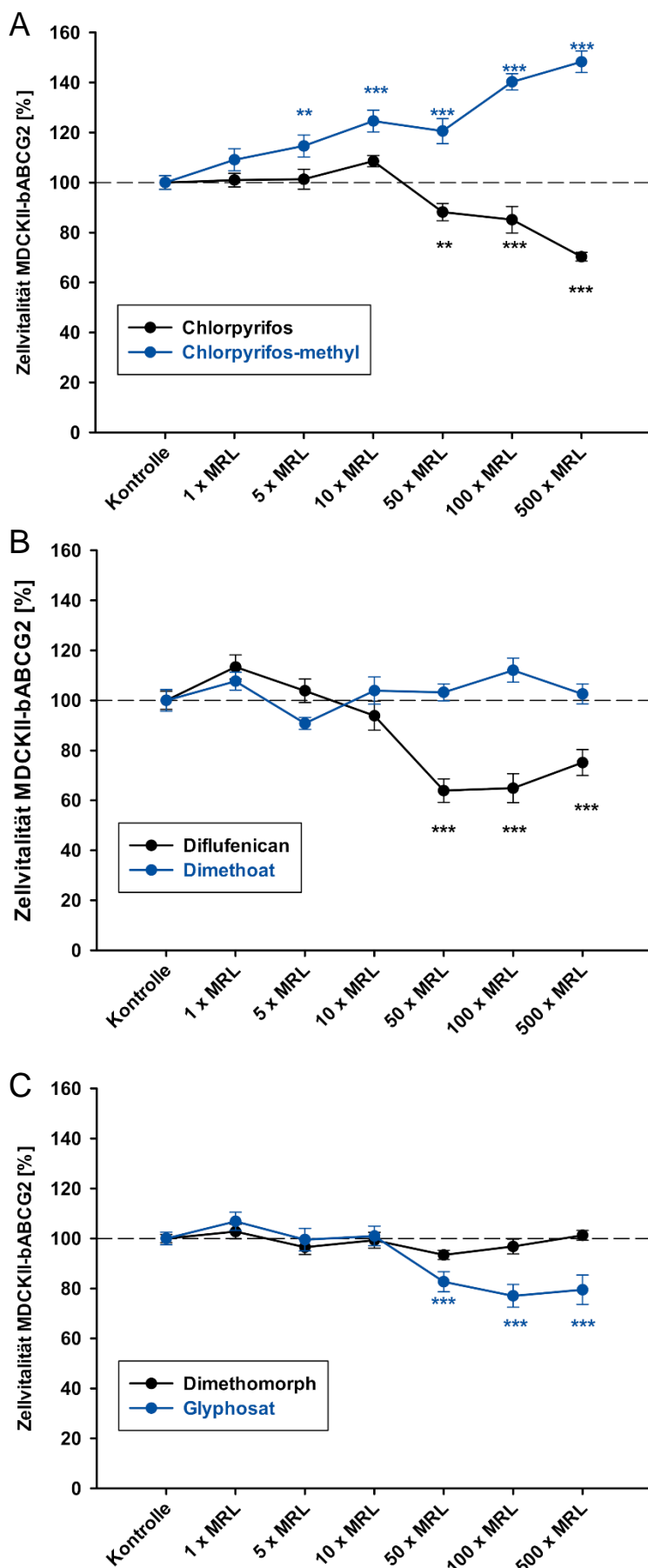


Abb. 13 Ergebnisse des WST-1 Zytotoxizitätsassays für Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Diflufenican, Dimethoat, Dimethomorph und Glyphosat. MDCKII-bABCG2-Zellen wurden für 72 h mit der 1- bis 500-fachen MRL-Konzentration der ausgewählten Pestizide sowie mit der höchsten und niedrigsten Lösungsmittelkonzentration (nicht gezeigt) inkubiert. Anschließend wurde die Zellviitalität spektralphotometrisch bestimmt und relativ zur Kontrolle (100 %) berechnet. **A.** Inkubation mit Chlorpyrifos (0,1 % oder 0,2 % Methanol) und Chlorpyrifos-methyl (0,08 % oder 0,2 % Methanol) **B.** Inkubation mit Diflufenican und Dimethoat (0,1 % oder 0,2 % Methanol) **C.** Inkubation mit Dimethomorph (0,1 % oder 0,2 % Methanol) und Glyphosat (0,2 % oder 0,4 % MilliQ). Dargestellte Werte entsprechen $MW \pm SEM$ ($n \geq 12$, One-Way-ANOVA Holm-Šidák post hoc Test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ signifikant zur unbehandelten Kontrolle)

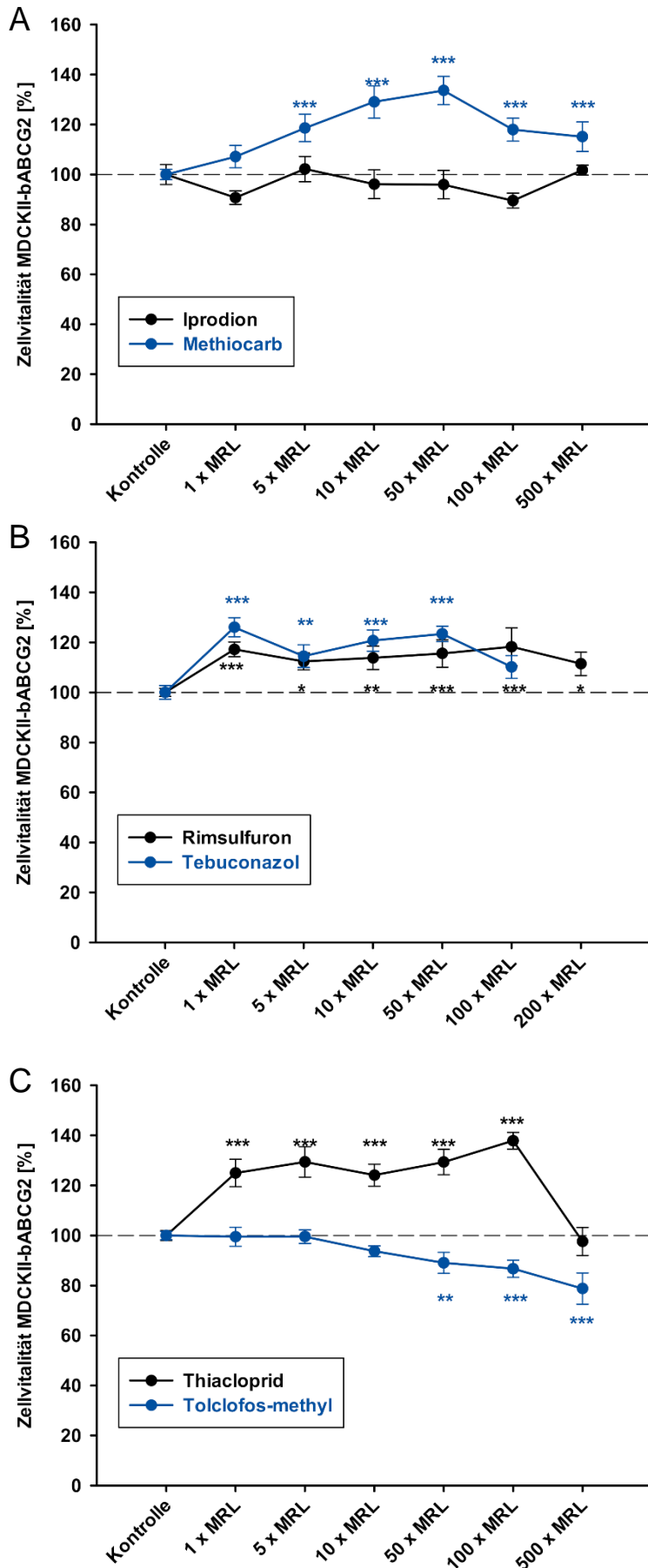


Abb. 14 Ergebnisse des WST-1 Zytotoxizitätsassays für Iprodion, Methiocarb, Rimsulfuron, Tebuconazol, Thiachloprid und Tolclofos-methyl. MDCKII-bABCG2-Zellen wurden für 72 h mit der 1- bis 500-fachen MRL-Konzentration der ausgewählten Pestizide sowie mit der höchsten und niedrigsten Lösungsmittelkonzentration (nicht gezeigt) inkubiert. Anschließend wurde die Zellvitalität spektral-photometrisch bestimmt und relativ zur Kontrolle (100 %) berechnet. **A.** Inkubation mit Iprodion (0,1 % oder 0,5 % Methanol) und Methiocarb (0,05 % oder 0,1 % Xylol) **B.** Inkubation mit Rimsulfuron (0,1 % oder 0,5 % Ethylacetat) und Tebuconazol (0,05 % oder 0,1 % Toluol) **C.** Inkubation mit Thiachloprid (0,11 % oder 0,56 % Ethylacetat) und Tolclofos-methyl (0,1 % oder 0,5 % Methanol). Dargestellte Werte entsprechen MW \pm SEM ($n \geq 12$, One-Way-ANOVA Holm-Šidák post hoc Test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ signifikant zur unbehandelten Kontrolle)

4.4 Interaktionen von Pestiziden am bABCG2-Transporter

Zur Identifikation möglicher bABCG2-Substrate wurden MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen mit den ausgewählten 14 Pestiziden (s. Tabelle 3, S. 45) in 0,1-, 1- und 10-facher MRL-Konzentration für 4 h inkubiert und anschließend die Hoechst 33342-Akkumulation fluoressenzphotometrisch bestimmt (s. 3.2.4). Stellt ein Pestizid ein Substrat oder Inhibitor des bovinen ABCG2-Transporters dar, dann wird die Transportrate des bABCG2-Substrates Hoechst 33342 limitiert und der Fluoreszenzfarbstoff reichert sich intrazellulär an. Dabei wurde die relative intrazelluläre Farbstoffakkumulation von MDCKII-bABCG2-Zellen in Relation zu MDCKII-Mock-Zellen berechnet und die Pestizid-behandelten Zellen stets im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle betrachtet. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 grafisch dargestellt und die signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle gekennzeichnet. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde jedoch auf die Darstellung der Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationen verzichtet.

Für Chlorpyrifos-methyl, Diflufenican, Glyphosat, Ioxynil (s. Abb. 15 A), Iprodion, Methiocarb, Prochloraz, Rimsulfuron, Tebuconazol und Thioclopid (s. Abb. 15 B) konnten signifikant erhöhte H33342-Gehalte gegenüber der Kontrolle detektiert werden. Dabei verursachten das Insektizid Chlorpyrifos-methyl (s. Abb. 15 A) und das Fungizid Tebuconazol (s. Abb. 15 B) ab 0,1-facher MRL-Konzentration (6,2 nM, 32,5 nM) einen Anstieg der intrazelluläre Farbstoffgehalte um ca. 50 %. Dieser intrazelluläre Anstieg erreichte in 0,1- bis 10-facher MRL-Konzentration Signifikanzniveau gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches konnte weder für Chlorpyrifos-methyl noch für Tebuconazol eine konzentrationsabhängige Steigerung ermittelt werden. Im Gegenteil, Chlorpyrifos-methyl-behandelte Zellen wiesen eine leicht abnehmende Tendenz zwischen 0,1- bis 10-facher MRL-Konzentration auf, die sich jedoch zwischen den Konzentrationen nicht signifikant unterschied (s. Abb. 15 A).

Ab der 1-fachen MRL-Konzentration konnte für Diflufenican und Glyphosat (s. Abb. 15 A), sowie Methiocarb, Prochloraz, Rimsulfuron und Thioclopid (s. Abb. 15 B) eine signifikante, teils konzentrationsabhängige Zunahme der H33342-Akkumulation beobachtet werden. Das Herbizid Diflufenican erhöhte in 1-facher MRL-Konzentration (25 nM) die Farbstoffakkumulation signifikant um ca. das Doppelte. Die 10-fache MRL-Konzentration (250 nM) verursachte eine weitere signifikante, konzentrationsabhängige Steigerung der Hoechst-Akkumulation (2,5-fach) gegenüber der Kontrolle (s. Abb. 15 A), sowie gegenüber der 1-fachen MRL-Konzentration. Das Herbizid Glyphosat führte in 1-facher MRL-

Ergebnisse

Konzentration (296 nM) zu einer signifikanten Verdopplung des detektierten Hoechst-Gehaltes in MDCKII-Zellen. In 10-facher MRL-Konzentration (2,96 µM) kam es zu einer leichten Abnahme der Fluoreszenz, die dennoch signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht war und keinen signifikanten Unterschied zur 1-fachen MRL-Konzentration aufwies (s. Abb. 15 A).

Die Inkubation der MDCKII-Zellen mit Methiocarb und Prochloraz in 1-facher MRL-Konzentration (44 nM, 80 nM) führte ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der Farbstoffakkumulation um das 2,3- bzw. 1,7-Fache (s. Abb. 15 B). In der 10-fachen MRL-Konzentration (440 nM, 800 nM) verursachten die beiden Stoffe eine 2,0- bzw. 1,5-fache intrazelluläre Anreicherung, die jedoch gegenüber der Kontrolle Signifikanzniveau erreichte.

Für das Insektizid Thiacloprid konnte in MDCKII-Zellen eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme der Hoechst-Akkumulation in 0,1-facher MRL-Konzentration (19,8 nM) detektiert werden. In 1- und 10-facher MRL-Konzentration (198 nM, 1,98 µM) führte Thiacloprid schließlich zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Zunahme der intrazellulären Farbstoffanreicherung (s. Abb. 15 B). Im Hoechst-Akkumulationsassay konnte für Rimsulfuron sowohl in 1-facher (116 nM) als auch in 10-facher MRL-Konzentration (1,16 µM) eine signifikante Steigerung um ca. 30 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (s. Abb. 15 B).

Hingegen konnte für das Herbizid Ioxynil und das Fungizid Iprodion erst in 10-facher MRL-Konzentration eine signifikante Beeinflussung der bABCG2-vermittelten Hoechst-Akkumulation ermittelt werden. Ioxynil erreichte in 10-facher MRL-Konzentration (2,7 µM) eine um 1,7-fach erhöhte Zunahme der Farbstoffanreicherung in den Zellen (s. Abb. 15 A), die sich sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber der 0,1- und 1-fachen MRL-Konzentration signifikant verhielt (s. Abb. 15 A). Bei einer Inkubation mit Iprodion in 0,1-facher und 1-facher MRL-Konzentration (30,3 nM, 303 nM) nahm die intrazelluläre Fluoreszenz um ca. 30 % leicht zu und erreichte in 10-facher MRL-Konzentration (3,03 µM) Signifikanzniveau gegenüber der Kontrolle.

Die Insektizide Chlorpyrifos und Dimethoat, sowie die Fungizide Dimethomorph und Tolclofos-methyl zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine signifikante Zunahme der intrazellulären Hoechst-Akkumulation (s. Abb. 15). Nur die Inkubation mit Dimethoat in 10-facher MRL-Konzentration (440 nM) führte zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der relativen Hoechst-Akkumulation.

Ergebnisse

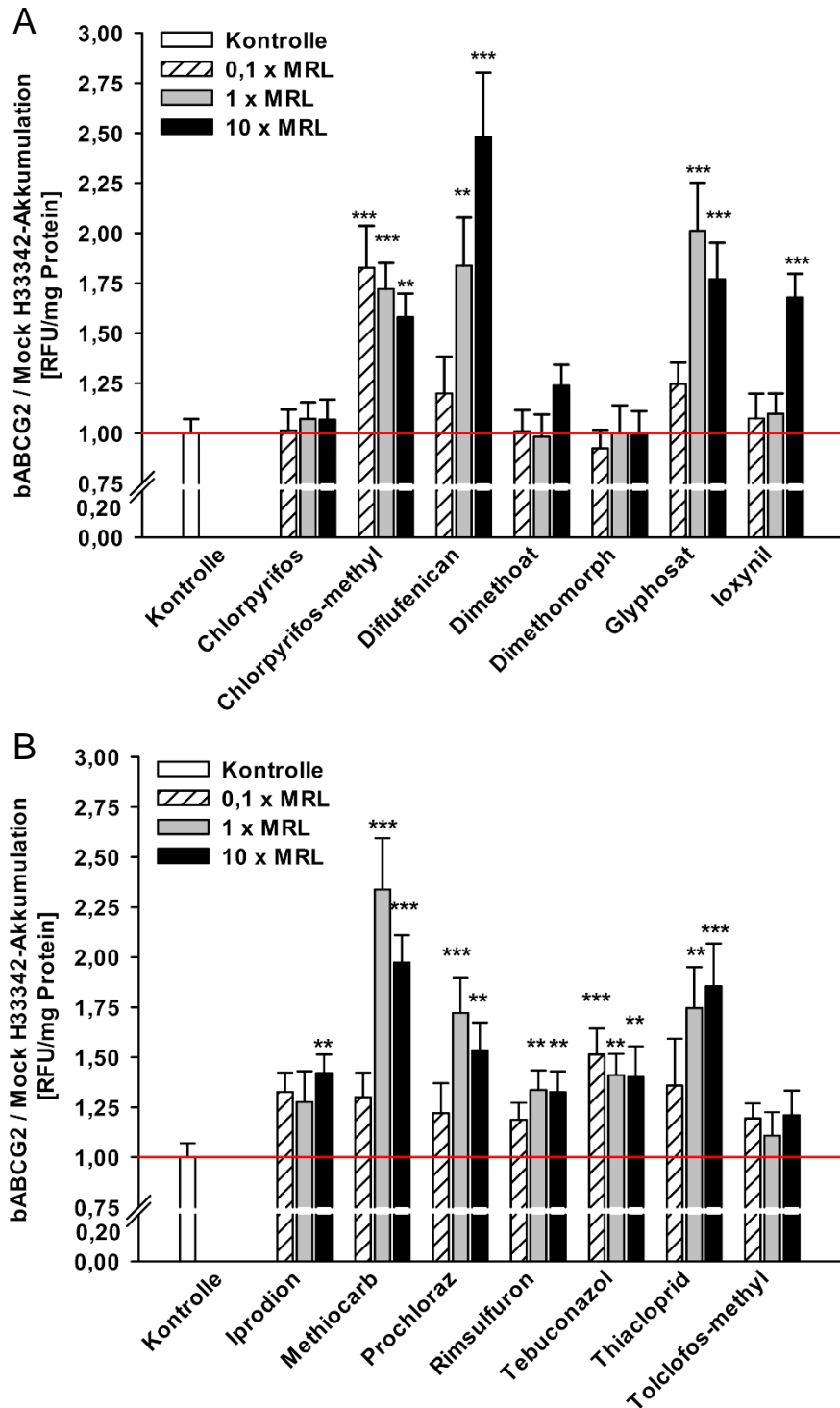


Abb. 15 Effekt ausgewählter Pestizide auf die Hoechst 33342-Akkumulation in MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen. MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen wurden 4 h mit der 0,1-, 1- oder 10-fachen MRL-Pestizidkonzentration (s. Tabelle 2 S. 31) inkubiert. Anschließend wurde die intrazelluläre Hoechst 33342 Akkumulation detektiert und in Relative Fluorescence Units (RFU) pro mg Protein im Vergleich zu MDCKII-Mock-Zellen berechnet. (MW \pm SEM, $n \geq 12$, One-Way-ANOVA Holm-Šidák post hoc Test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ signifikant zur unbehandelten Kontrolle). Auf die Darstellung der Signifikanzunterschiede zwischen den Konzentrationen wurde aufgrund der besseren Übersichtlichkeit verzichtet.

4.5 Pestizidwechselwirkungen am bABCG2-Transporter

Um mögliche Wechselwirkungen von Mehrfachrückständen am bovinen ABCG2-Transporter zu detektieren, wurden MDCKII-bABCG2-Zellen sowie MDCKII-Mock-Zellen mit der 1-fachen MRL-Pestizidkonzentration allein oder in den aufgeführten Kombinationen (s. Tabelle 4, S. 47) für 4 h inkubiert. Anschließend wurde die zeitabhängige zelluläre H33342-Akkumulation in Anwesenheit des jeweiligen Pflanzenschutzmittels oder der jeweiligen Kombination über 15 min bestimmt (s. 3.2.4.2). Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Abb. 16, Abb. 17 und Abb. 18. Dabei wurden sowohl signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber der Pestizidkombination gekennzeichnet.

Von den ausgewählten Pflanzenschutzmitteln wurden Methiocarb mit Chlorpyrifos-methyl, Glyphosat mit Chlorpyrifos-methyl, sowie Dimethomorph mit Iprodion häufig gemeinsam in einem Lebensmittel detektiert (MELUND 2012, EFSA 2014c). Ihr Einfluss auf die bABCG2-vermittelte Hoechst-Anreicherung wurde, wie aus Abb. 16 hervorgehend, ermittelt. Die Insektizide Methiocarb und Chlorpyrifos-methyl führten bei alleiniger Inkubation zu einer um 50 % signifikant gesteigerten intrazellulären Farbstoffanreicherung. Die Kombination von Methiocarb und Chlorpyrifos-methyl führte in 1-facher MRL-Konzentration zu einer signifikanten Steigerung (ca. 2,5-Fach) der zellulären H33342-Akkumulation im Vergleich zur Einzelpestizidinkubation (s. Abb. 16 A).

Auch die alleinige Inkubation mit Glyphosat und Chlorpyrifos-methyl (s. Abb. 16 B) sowie die Kombination dieser beiden Pestizide führte im Vergleich zur Kontrolle zu einem signifikanten Anstieg der Hoechst-Akkumulation um das 1,5-Fache. Jedoch wies die Kombination von Glyphosat und Chlorpyrifos-methyl keinen signifikant erhöhten intrazellulären H33342-Gehalt im Vergleich zur Einzelpestizidinkubation auf.

Weder die Kombination von Dimethomorph mit Iprodion, noch die Einzelsubstanzen führten in 1-facher MRL-Konzentration zu einer Zunahme der H33342-Akkumulation (s. Abb. 16 C).

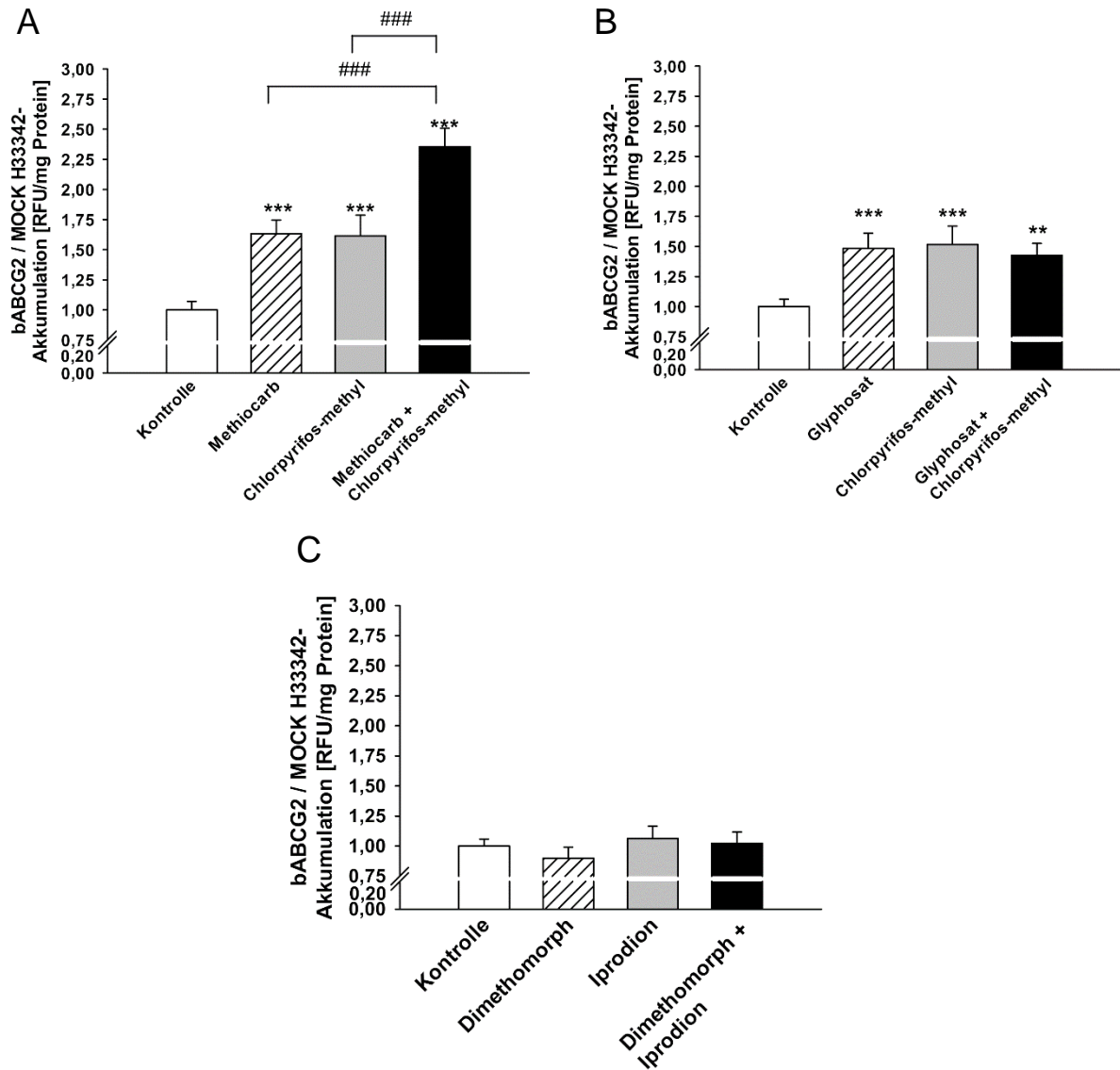


Abb. 16 Effekt häufig gemeinsam detektierter Pestizidkombinationen auf die zelluläre Hoechst 33342-Akkumulation in MDCKII-Zellen. MDCKII-bABCG2- oder MDCKII-Mock-Zellen wurden mit 1-fachen MRL-Gehalten von Methiocarb (44 nM), Chlorpyrifos-methyl (62 nM), Glyphosat (296 nM), Dimethomorph (52 nM) und Iprodion (303 nM) allein oder in Kombination für 4 h inkubiert. Danach wurde die bABCG2-vermittelte H33342-Exkretion, wie in 3.2.4.2 beschrieben, bestimmt. (MW \pm SEM, $n \geq 12$, One-Way-ANOVA Holm-Šidák post hoc Test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ signifikant zur unbehandelten Kontrolle, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$ signifikant zur Pestizidkombination)

Kombinationen aus Prochloraz und Tebuconazol, sowie aus Ioxynil und Diflufenican sind für den Handel in Deutschland zugelassen (BVL 2014c). Die Fungizide Prochloraz und Tebuconazol führten im Hoechst-Assay einzeln zu einer signifikanten Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz um das 1,3- bzw. 1,7-Fache gegenüber der Kontrolle (s. Abb. 17 A). Mit Prochloraz und Tebuconazol gleichzeitig inkubierte MDCKII-Zellen wiesen eine 1,3-fach erhöhte Farbstoffakkumulation auf, die sich sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber der alleinigen Inkubation mit Tebuconazol signifikant verhielt.

Wie in Abb. 17 B dargestellt, verursacht die alleinige Inkubation mit Diflufenican sowie die gleichzeitige Applikation von Ioxynil mit Diflufenican in 1-facher MRL-Konzentration eine um ca. 50 % gesteigerte Farbstoffanreicherung gegenüber der Kontrolle. Jedoch blieb die Hoechst-Akkumulation bei alleiniger Inkubation mit Ioxynil gegenüber der Kontrolle unverändert. Die kombinierte Anwendung der Herbizide Ioxynil und Diflufenican verursachte gegenüber den Einzelinkubationen keine weitere Steigerung der H33342-Gehalte (s. Abb. 17 B).

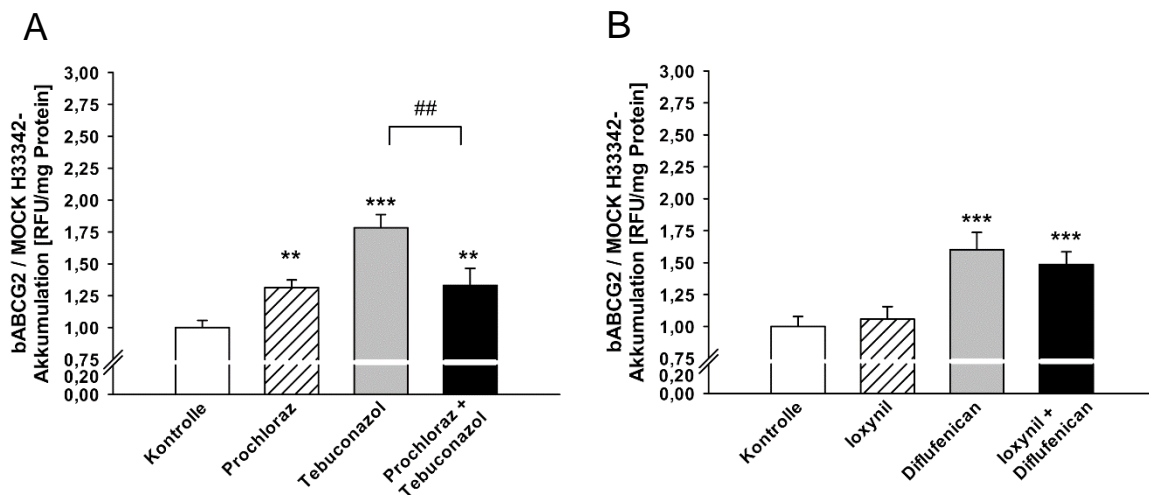


Abb. 17 Effekt im Handel erhältlicher Pestizidkombinationen auf die zelluläre Hoechst 33342-Akkumulation in MDCKII-Zellen. MDCKII-bABCG2- oder MDCKII-Mock-Zellen wurden mit 1-fachen MRL-Gehalten von Prochloraz (80 nM), Tebuconazol (325 nM), Ioxynil (2,7 μ M) und Diflufenican (25 nM) allein oder in Kombination für 4 h inkubiert. Danach wurde die bABCG2-vermittelte H33342-Exkretion, wie in 3.2.4.2 beschrieben, bestimmt. (MW \pm SEM, $n \geq 12$, One-Way-ANOVA Holm-Šidák post hoc Test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ signifikant zur unbehandelten Kontrolle, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$ signifikant zur Pestizidkombination)

Nachfolgend wurde der Einfluss von Glyphosat und Rimsulfuron, die in der Maisproduktion gemeinsam angewendet werden, auf die bABCG2-vermittelte Hoechst-Sekretion ermittelt (KUHLMANN 2014). Im Hoechst-Akkumulationsassay konnte gezeigt werden, dass die Einzelsubstanzen sowohl in 1-facher als auch in 10-facher MRL-Konzentration die intrazelluläre Farbstoffanreicherung um mehr als 50 % erhöhen (s. Abb. 15). Eine kombinierte Anwendung von Glyphosat und Rimsulfuron in 1-facher MRL-Konzentration verursachte eine schwache, statistisch nicht signifikante Steigerung der H33342-Akkumulation um ca. 25 % gegenüber der Einzelpestizidinkubation (s. Abb. 18 A). Da die Maissilage ein Hauptfuttermittel für milchliefernde Rinder (JEROCH et al. 1999) und somit von besonderer Bedeutung ist, wurde ein Folgeversuch mit 10-facher MRL-Konzentration von Glyphosat und Rimsulfuron durchgeführt. Die gleichzeitige Inkubation in 10-facher MRL-Konzentration führte zu einer signifikanten Zunahme der intrazellulären H33342-Gehalte um fast das Doppelte im Vergleich zur Einzelpestizidinkubation (s. Abb. 18 B).

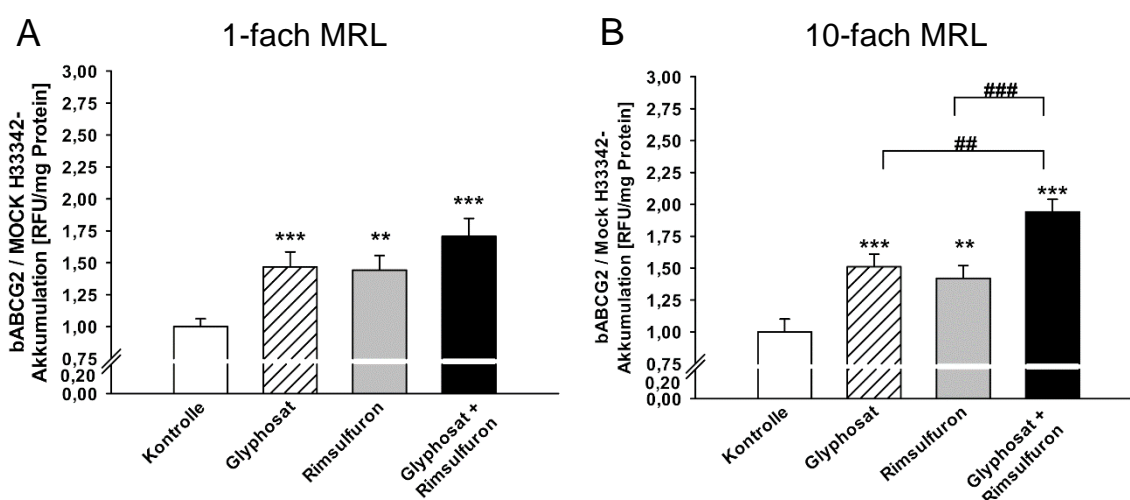


Abb. 18 Effekt von Glyphosat und Rimsulfuron, sowie deren Kombination auf die zelluläre Hoechst 33342-Akkumulation in MDCKII-Zellen. MDCKII-bABCG2- oder MDCKII-Mock-Zellen wurden mit **A.** 1-facher und **B.** 10-facher MRL-Konzentrationen von Glyphosat (**A.** 296 nM, **B.** 2,96 µM) und Rimsulfuron (**A.** 116 nM, **B.** 1,16 µM), allein oder in Kombination für 4 h inkubiert. Danach wurde die bABCG2-vermittelte H33342-Exkretion, wie in 3.2.4.2 beschrieben, bestimmt. (MW ± SEM, n ≥ 12, One-Way-ANOVA Holm-Šidák post hoc Test, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 signifikant zur unbehandelten Kontrolle, # p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01, ### p ≤ 0,001 signifikant zur Pestizidkombination)

5 Diskussion

Bei der Herstellung von Futter- und Lebensmitteln in der konventionellen Landwirtschaft werden große Mengen an Pflanzenschutzmitteln eingesetzt (BVL 2017a), die durch verbleibende Rückstände in die Lebensmittelkette eingetragen werden können (MCEWEN und MCNAB 1997, KHANIKI 2007, COM 2008). Besonders bedenklich ist hierbei die Belastung milchliefernder Rinder durch Pflanzenschutzmittelrückstände in Futtermitteln, die eine Anreicherung dieser Rückstände in der Milch nach sich ziehen und infolge der chronischen Exposition zu einer gesundheitlichen Beeinträchtigung der Verbraucher führen könnte (KHANIKI 2007, TSIPLAKOU et al. 2010, PIRSAHEB et al. 2015). Eine Exkretion der Pflanzenschutzmittelrückstände in die Milch könnte durch den ABCG2-Transporter erfolgen, da dieser im laktierenden Rindereuter den Haupttransportweg für Fremdstoffe in die Milch darstellt (JONKER et al. 2005). Im Rahmen der Zulassungsstudien wird zwar eine mögliche Sekretion von Pflanzenschutzmitteln in die Milch i. d. R. durch Fütterungsversuche mit Ziegen abgeschätzt, allerdings werden dafür nur wenige Tiere in die Studien aufgenommen (OECD 2007). Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass sich das Substratspektrum von Transportern verschiedener milchliefernder Tierarten, wie Ziege, Schaf und Rind, unterscheidet (WASSERMANN et al. 2013b), sodass aufgrund fehlender speziesspezifischer Untersuchungen bislang unklar ist, welche Substanzen als Substrate des bovinen ABCG2-Transporters aktiv in die Milch sezerniert werden.

Um mögliche Interaktionen verschiedener Pflanzenschutzmittel und deren Kombinationen mit dem bovinen ABCG2-Transporter zu detektieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein indirektes, fluoreszenzphotometrisches Messverfahren in einem *In-vitro*-Zellmodell angewendet.

5.1 Zellmodell

In den hier vorgestellten Studien wurde ein MDCKII-Zellmodell genutzt, das eine stabile Überexpression des bovinen ABCG2-Transporters aufweist (WASSERMANN et al. 2013b). Überexprimierende Zelllinien werden in der Literatur häufig für die Durchführung von Transporterstudien angeführt (HEGEDUS et al. 2009, ITC 2010, JUALE et al. 2013, JANI et al. 2014). MDCKII-Zellen sind dafür besonders gut geeignet, da sie einen Monolayer aus polarisierten Zellen ausbilden, der dem Laktozyten-Zellverband der Milchdrüse ähnelt

(WASSERMANN et al. 2013a). Das genutzte MDCKII-Zellmodell exprimiert den bovinen ABCG2-Transporter stabil an der apikalen Membran, was der *In-vivo*-Lokalisation des Transporters entspricht (LINDNER et al. 2013, WASSERMANN et al. 2013b). Darüber hinaus konnten mit diesem Zellmodell bereits erfolgreich verschiedene Veterinärarzneimittel sowie Aflatoxine als potentielle bABCG2-Substrate identifiziert werden (WASSERMANN et al. 2013b, MANZINI et al. 2017). Aufgrund der bekannten speziesspezifischen Expression von ABC-Transportern (SCHRICKX und FINK-GREMMELS 2008) und der Unterschiede im Substratspektrum verschiedener milchliefernder Wiederkäuer (WASSERMANN et al. 2013b), ist die Anwendung eines speziesspezifischen Modells notwendig. Demnach steht durch dieses *In-vitro*-Modell ein Zellmodell für das laktierende Rindereuter zur Verfügung, welches eine Charakterisierung des bovinen ABCG2-Substratspektrums ermöglicht.

Aufgrund einer möglichen endogenen ABCG2-Expression der MDCKII-Zellen sind vergleichende Studien zwischen überexprimierenden Zellen und MDCKII-Mock-Kontrollzellen zwingend erforderlich (JANI et al. 2014). Die generierten MDCKII-Mock-Zellen weisen keine Überexpression des bovinen ABCG2-Transporters auf, wurden jedoch mit dem caprinen ABCG2-Transporter invers, in 3'→5' Richtung, stabil transfiziert (WASSERMANN et al. 2013b). Demnach kann in den Studien durch die Betrachtung der übertransfizierten Zellen (MDCKII-bABCG2-Zellen) im Vergleich zu den MDCKII-Mock-Zellen die Beteiligung möglicher endogener Transportvorgänge ausgeschlossen werden.

5.2 Zellvitalitätsstudien in MDCKII-bABCG2-Zellen

Zu Beginn der Studien wurde anhand des WST-1 Assays geprüft, ob die jeweils eingesetzten Pestizidkonzentrationen auf die MDCKII-Zellen zytotoxisch wirken. Die Methode des WST-1 Tests basiert auf dem Prinzip, dass lebende Zellen eine mitochondriale Dehydroxylase-Aktivität aufweisen und so Tetrazoliumsalz zu wasserlöslichem Formazan reduzieren können, wodurch ein dunkelroter Farbumschlag entsteht (RODE 2008, ADAN et al. 2016). Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen, kostengünstigen Anwendung, sowie in der Möglichkeit adhärente Zellen auch über längere Inkubationszeiten zu untersuchen und einen IC₅₀-Wert zu ermitteln. Der WST-1 Assay ermöglicht keine Unterscheidung zwischen zytotoxischen und zytostatischen Effekten, da beide mit einer verminderten Formazanbildung einhergehen. Jedoch war dies für die hier vorgestellte Fragestellung unbedeutend (ADAN et al. 2016).

Für die Ermittlung der Zellvitalität wurde aus Sicherheitsgründen eine längere Inkubationszeit (72 h) gewählt als anschließend für den Hoechst-Assay (4 h) benötigt. So konnten sowohl kurzfristige als auch langfristige toxische Effekte ausgeschlossen werden.

Es gibt wenige externe Studien, die die Zytotoxizität von Pestiziden an MDCKII-Zellen beschreiben, sodass im Folgenden vorrangig Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe zum Vergleich herangezogen wurden. Für Tebuconazol, das keine Reduktion der MDCKII-bABCG2-Zellvitalität verursacht, konnten keine Vergleichswerte für MDCKII-Zellen oder Euterepithelzellen gefunden werden.

Eine Behandlung der Zellen mit Ioxynil führte in höheren Konzentrationen zu einer Abnahme der Vitalität und ermöglichte eine Berechnung des IC_{50} -Wertes (97,5 μ M, s. Abb. 11). Jedoch konnte im WST-1 Assay gezeigt werden, dass die 0,1- bis 10-fache MRL-Konzentration keinen Einfluss auf das Zellüberleben hat und die höchste eingesetzte 10-fache MRL-Konzentration (27 μ M) nur ein Drittel des ermittelten IC_{50} -Wertes (97,5 μ M) beträgt. In einer hauseigenen Studie von HALWACHS et al. (2016a) wurde erstmals die Zellvitalität von Ioxynil in MDCKII-Zellen bestimmt, die jedoch stabil mit dem plazentaren ABCG2-Transporter des Kaninchens (MDCKII-rbABCG2) transfiziert waren. Hierbei konnte bei einer vierstündigen Inkubation, auch in höchster Konzentration (540 μ M), keine Beeinflussung der Zellvitalität beobachtet werden. Die unterschiedlichen Toxizitäten könnten durch die kürzere Inkubationszeit von 4h im Vergleich zu 72 h begründet werden. Demzufolge vermindert Ioxynil erst nach längerer Inkubation (72 h) in Konzentrationen oberhalb des 10-fachen MRL-Wertes die Zellvitalität von MDCKII-Zellen.

Wie in der Literatur beschrieben, stellt Prochloraz mit einer Zytotoxizität von > 40 μ M die Substanz mit der höchsten Toxizität unter den ausgewählten Pestiziden dar. Studien an MDCKII-cABCG2-Zellen, sowie an humanen Leberzellen (TV101L) und Rattenleberzellen (H4IIE) konnten ebenfalls zeigen, dass Prochloraz in den genannten Zelllinien toxischer wirkt als Chlorpyrifos, Dimethoat, Iprodion, Methiocarb und Tolclofos-methyl (LONG et al. 2003, HALWACHS et al. 2014). Darüber hinaus konnte für eine 72-stündige Inkubation mit Prochloraz für MDCKII-Zellen, die eine Überexpression des caprinen mammären ABCG2-Transporters aufweisen (MDCKII-cABCG2), ein IC_{50} -Wert von 9,34 μ M ermittelt werden (HALWACHS et al. 2014). Interessanterweise war eine 72-stündige Inkubation mit Iprodion, auch in der höchsten Konzentration (151,5 μ M), untoxisch für MDCKII-bABCG2-Zellen (s. Abb. 14 A), während für MDCKII-cABCG2-Zellen ein IC_{50} -Wert von 11,41 μ M detektiert wurde (HALWACHS et al. 2014). Auch für Prochloraz wurden unterschiedliche IC_{50} -Werte im

Vergleich zu MDCKII-cABCG2-Zellen bestimmt (IC_{50} MDCKII-bABCG2-Zellen $> 40 \mu\text{M}$; IC_{50} MDCKII-cABCG2-Zellen $9,36 \mu\text{M}$, HALWACHS et al. 2014). Insgesamt scheinen MDCKII-cABCG2-Zellen sensibler auf eine 72-stündige Inkubation mit Prochloraz oder Iprodion zu reagieren als MDCKII-bABCG2-Zellen.

Weiterhin wurde eine abnehmende Vitalität für Chlorpyrifos (s. Abb. 13 A), Diflufenican (s. Abb. 13 B), Glyphosat (s. Abb. 13 C) und Tolclofos-methyl (s. Abb. 14 C) in MDCKII-bABCG2-Zellen detektiert. In der Literatur ist nur ein IC_{50} -Wert für Tolclofos-methyl und MDCKII-cABCG2-Zellen von $21,05 \mu\text{M}$ (72 h) beschrieben worden (HALWACHS et al. 2014). Diese Konzentration ist höher als die hier maximal getestete 500-fache MRL-Konzentration ($16,5 \mu\text{M}$), die zu einer Vitalität von $79 \% \pm 6,3$ in MDCKII-bABCG2-Zellen führt, sodass sich die Zytotoxizität von Tolclofos-methyl in den beiden MDCKII-Zelllinien ähnelt. Chlorpyrifos, Diflufenican, Glyphosat und Tolclofos-methyl wiesen bei vierstündiger Inkubation in MDCKII-rbABCG2-Zellen auch in der jeweils höchsten getesteten Konzentration ($285 \mu\text{M}$, $13 \mu\text{M}$, $148 \mu\text{M}$, $17 \mu\text{M}$) keine Abnahme der Zellvitalität auf (HALWACHS et al. 2016a). Im Vergleich zur vierstündigen Inkubation von MDCKII-rbABCG2-Zellen, scheint die Toxizität von Chlorpyrifos, Diflufenican, Glyphosat und Tolclofos-methyl für MDCKII-Zellen bei längerer Inkubationsdauer, wie hier 72 h, zu steigen.

Es konnte keine Abnahme der Vitalität der MDCKII-Zellen weder für 4 h (MDCKII-rbABCG2-Zellen, HALWACHS et al. 2016a), noch für 72 h (MDCKII-bABCG2-Zellen) Inkubation mit Chlorpyrifos-methyl ($31 \mu\text{M}$), Dimethoat ($22 \mu\text{M}$), Dimethomorph ($26 \mu\text{M}$), Methiocarb (MDCKII-rbABCG2: $440 \mu\text{M}$; MDCKII-bABCG2: $22,2 \mu\text{M}$), Rimsulfuron (MDCKII-rbABCG2: $12 \mu\text{M}$; MDCKII-bABCG2: $23,2 \mu\text{M}$) und Thiacloprid (MDCKII-rbABCG2: $396 \mu\text{M}$; MDCKII-bABCG2: $98,95 \mu\text{M}$) beobachtet werden (HALWACHS et al. 2016a). Diese Pflanzenschutzmittel scheinen keine veränderte Toxizität in Abhängigkeit der Inkubationsdauer aufzuweisen.

Für Chlorpyrifos-methyl, Methiocarb, Rimsulfuron, Tebuconazol, Thiacloprid sowie für die Lösungsmittelkontrollen 0,1 % Toluol und Ethylacetat wurde sogar bei geringen Pestizidkonzentrationen eine signifikante Zunahme der Formazanmenge über das Kontrollniveau beobachtet. Wie für Thiacloprid, Tebuconazol und Methiocarb gezeigt, folgt dieser Zunahme teilweise eine Abnahme der Vitalität auf Kontrollniveau. Dieser Effekt wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits häufiger beobachtet und auch von NIEKE (2014) für LS-180 Zellen beschrieben. Wie für MDCKII-cABCG2-Zellen gezeigt, besitzen MDCKII-Zellen eine induzierbare AhR-Signalkaskade (HALWACHS et al. 2014). Verschiedene Fremdstoffe, wie

auch TCDD, zählen zu den AhR-Agonisten und können die Zellproliferation durch Wechselwirkung mit verschiedenen Signalwegen beeinflussen (YIN et al. 2016). Chlorpyrifos-methyl, Methiocarb, Rimsulfuron, Tebuconazol, Thiacloprid, sowie Toluol und Ethylacetat könnten demnach AhR-vermittelt die Zellproliferation steigern und somit eine erhöhte metabolische Aktivität verursachen. Andererseits wäre auch eine Pestizid-vermittelte Aktivierung des Zellmetabolismus denkbar. Dies war jedoch für die Studien zur Interaktion von Pflanzenschutzmitteln mit dem bovinen ABCG2-Transporter nicht relevant, sodass dieser Zusammenhang nicht intensiver untersucht wurde.

Das Insektizid Dimethoat und das Fungizid Dimethomorph beeinflussten in keiner Konzentration (500-fache MRL-Konzentration: 22 μ M, 26 μ M) die Zellvitalität der MDCKII-bABCG2-Zellen (s. Abb. 13 B und C). Während die vierstündige Inkubation von MDCKII-rbABCG2-Zellen mit Dimethoat auch in höchster Konzentration (22 μ M) keine Beeinträchtigung der Zellvitalität verursachte, konnte für eine Behandlung mit Dimethomorph bis 13 μ M keine und ab 39 μ M eine abnehmende Zellvitalität beobachtet werden (HALWACHS et al. 2016a). Demnach scheinen Dimethoat und Dimethomorph keine veränderte Toxizität bei längerer Inkubationsdauer aufzuweisen.

Insgesamt konnte durch den WST-1 Zytotoxizitätsassay für alle ausgewählten Substanzen innerhalb der eingesetzten 0,1- bis 10-fachen MRL-Konzentration ein Erhalt der Zellvitalität belegt werden. So konnten toxische Effekte bei den nachfolgend eingesetzten Pestizidkonzentrationen ausgeschlossen werden.

5.3 Pestizide als potentielle bABCG2-Substrate

Der bovine ABCG2-Transporter stellt nach aktuellem Kenntnisstand im Rindereuter den wichtigsten Transportweg für Fremdstoffe in die Milch dar (JONKER et al. 2005). So konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass eine Vielzahl an veterinärmedizinischen Arzneimitteln ABCG2-vermittelt in die Milch von Wiederkäuern transportiert werden können (PULIDO et al. 2006, PEREZ et al. 2009b, REAL et al. 2011, WASSERMANN et al. 2013a, WASSERMANN et al. 2013b, GONZÁLEZ-LOBATO et al. 2014, MAHNKE et al. 2016, OTERO et al. 2016b, BALLENT et al. 2018). Diese aktive Sekretion könnte zu einer Anreicherung von Fremdstoffen in der Milch und Milchprodukten führen, die eine potentielle Gefahr sowohl für Neonaten als auch für Verbraucher darstellen könnten (LESLIE et al. 2005, VAN HERWAARDEN und SCHINKEL 2006, JANI et al. 2014).

Auch Pflanzenschutzmittel, insbesondere Chlorkohlenwasserstoffe, können aufgrund ihres lipophilen Charakters bioakkumulieren und sich insbesondere in der fettreichen Milch anreichern (MCKELLAR et al. 1976, MCEWEN und MCNAB 1997, KHANIKI 2007, DARKO und ACQUAAH 2008, TSIPLAKOU et al. 2010, PIRSAHEB et al. 2015). Das führt dazu, dass in Milchproben auch HCB-Rückstände gefunden werden, obwohl die HCB-Anwendung in Deutschland seit Jahren verboten ist (MCEWEN und MCNAB 1997, VO (EG) 850/2004, DARKO und ACQUAAH 2008, BVL 2013a). Bislang konnten Pyrethroide (BEDI et al. 2015), Organophosphate (MCKELLAR et al. 1976, PAGLIUCA et al. 2006, BEDI et al. 2015) und Thiophosphorsäureester (BEDI et al. 2015) in Milchproben detektiert werden. Wie aus den genannten Studien hervorgeht, gibt es etliche Nachweise von Pflanzenschutzmittelrückständen in der Milch. Jedoch ist bislang unklar, über welchen Mechanismus diese in die Milch gelangen. Für Pflanzen, Insekten und Säugetiere konnten bereits Interaktionen von Pestiziden mit ABC-Transportern, wie MDR1 und MRP1, gezeigt werden (LESLIE et al. 2005, CHEDIK et al. 2018). CHEDIK et al. (2018) fassten in einem Übersichtsartikel Interaktionen von Pestiziden mit unterschiedlichen Membrantransportern zusammen. Die Autoren zeigten, dass verschiedene Pestizide mit ABC- und SLC-Transportern interagieren können. Insbesondere Pestizide, die als Substrate der Transporter die Toxikokinetik verändern, werden als kritisch für die menschliche Gesundheit bewertet. Darüber hinaus konnten zwei weitere Studien eine Interaktion von organochlorhaltigen Pestiziden, wie Endosulfan, Chlordan, Heptachlor, Chlordacon, DDT und seine Metabolite, sowie von Pyrethroiden (Permethrin, Resmethrin) mit dem humanen ABCG2-Transporter belegen (BIRCSAK et al. 2013, BUCHER et al. 2014). Für das Rindereuter konnte bislang nur gezeigt werden, dass veterinärmedizinisch-relevante Arzneimittel über den bovinen ABCG2 in die Milch transportiert werden. Ob der bABCG2-Carrier auch Pflanzenschutzmittel transportiert, ist bislang unbekannt. In der hier vorgestellten Arbeit wurde daher untersucht, ob 14 häufig in der konventionellen Landwirtschaft eingesetzte Pflanzenschutzmittel mit dem bovinen ABCG2-Transporter interagieren. Dafür wurde die intrazelluläre Hoechst-Anreicherung in MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen nach vierstündiger Pestizidinkubation fluoreszenzphotometrisch bestimmt (s. 3.2.4). Der Fluoreszenzfarbstoff H33342 diffundiert passiv in die Zellen und wird durch den ABCG2-Transporter aktiv sezerniert (s. Abb. 8). Im Hoechst-Akkumulationsassay führt eine Interaktion des Pestizids mit dem bABCG2-Transporter zu einer vermehrten intrazellulären Anreicherung des H33342-Farbstoffes im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dabei kann ein Pestizid die Transportrate des Hoechst-Farbstoffes reduzieren, indem es entweder als bABCG2-Substrat selbst transportiert wird oder

als Inhibitor den bABCG2-Transporter blockiert. Um den Einfluss möglicher endogen-exprimierter ABCG2-Transporter in MDCKII-Zellen auszuschließen, wurde in den Studien immer die relative Akkumulation von MDCKII-bABCG2- zu MDCKII-Mock-Zellen betrachtet (JANI et al. 2014).

Im Hoechst-Akkumulationsassay konnten die Pestizidwirkstoffe Chlorpyrifos-methyl (ab 6,2 nM), Diflufenican (ab 25 nM), Glyphosat (ab 296 nM), Ioxynil (ab 2,7 µM) (s. Abb. 15 A), Iprodion (ab 3,03 µM), Methiocarb (ab 44 nM), Prochloraz (ab 80 nM), Rimsulfuron (ab 116 nM), Tebuconazol (ab 32,5 nM) und Thiacloprid (ab 198 nM) (s. Abb. 15 B) als mögliche Substrate des bABCG2-Effluxtransporters der bovinen Milchdrüse identifiziert werden. Wie eingangs erwähnt, gibt es nur sehr wenige Studien, die sich mit Wechselwirkungen von Pestiziden und dem ABCG2-Transporter befassen (CHEDIK et al. 2018). Insbesondere gibt es keine vergleichbaren *In-vitro*-Studien, die sich mit dem Transport der hier ausgewählten Pflanzenschutzmittel in die Milch von Rindern beschäftigen. Aufgrund der Homologie der Proteinsequenz des humanen und bovinen ABCG2-Transporter (84,6 %, WASSERMANN et al. 2013b) wurden bekannte strukturelle Gemeinsamkeiten (SZAFRANIEC et al. 2014, TAYLOR et al. 2017) von typischen humanen ABCG2-Substraten mit den Molekülstrukturen der hier vorgestellten Verbindungen verglichen. SZAFRANIEC et al. (2014) und TAYLOR et al. (2017) fassten zusammen, dass Moleküle sieben bis 20 Kohlenstoffatome und hydrophobe Regionen für eine Interaktion mit dem bABCG2-Transporter benötigen. Im Hoechst-Assay konnte gezeigt werden, dass Stoffe mit maximal 20 Kohlenstoffatomen und hydrophoben Bestandteilen v. a. in Form von aromatischen Strukturen, wie Chlorpyrifos-methyl (s. Abb. 20), Diflufenican (s. Abb. A 1), Ioxynil (s. Abb. A 1), Iprodion (s. Abb. A 1), Methiocarb (s. Abb. A 1), Prochloraz (s. Abb. A 1), Rimsulfuron (s. Abb. A 2), Tebuconazol (s. Abb. A 2) und Thiacloprid (s. Abb. A 2), eine Bindung mit dem ABCG2-Protein eingehen können. Dimethomorph besitzt zwar zwei Benzolringe, könnte aber aufgrund seiner Größe (21 Kohlenstoffatome) sterisch zu anspruchsvoll für eine Interaktion mit dem ABCG2-Transporter sein (s. Abb. 19). Im Gegensatz dazu scheint Dimethoat mit fünf Kohlenstoffatomen zu klein für eine Interaktion mit dem bABCG2-Transporter zu sein (s. Abb. 19).

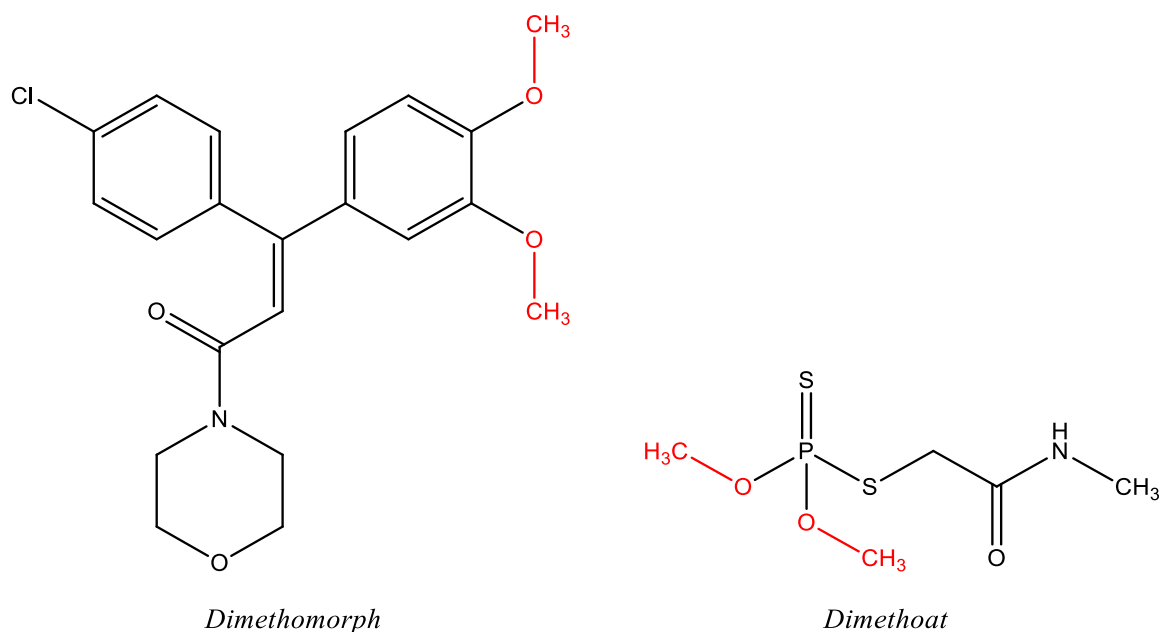


Abb. 19 Strukturformeln von Dimethomorph und Dimethoat.

Besonders interessant ist, dass Chlorpyrifos nicht mit dem Transporter wechselwirkt, während Chlorpyrifos-methyl eine deutliche Steigerung der ABCG2-vermittelten Hoechst-Akkumulation verursacht. Beide Substanzen weisen mit sieben bzw. neun Kohlenstoffatomen eine adäquate Länge auf und besitzen jeweils einen Pyridinring (s. Abb. 20). Jedoch weist Chlorpyrifos-methyl, im Gegensatz zu Chlorpyrifos, Methoxygruppen auf. Wie für ABCG2-Inhibitoren beschrieben, scheinen Methoxygruppen die Bindung in der postulierten Bindungstasche des ABCG2-Transporters zu begünstigen (JUVALE et al. 2013).

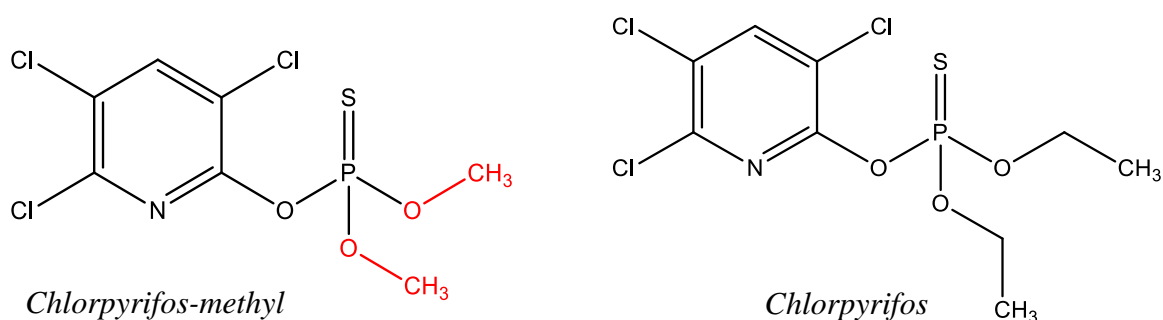
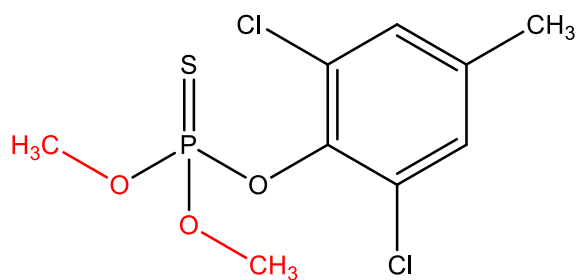


Abb. 20 Strukturformeln von Chlorpyrifos-methyl und Chlorpyrifos.

In Bezug auf die chemische Struktur stellt Tolclofos-methyl eine Ausnahme der aufgestellten Thesen dar (s. Abb. 21). Mit neun Kohlenstoffatomen, einem Benzolring und Methoxygruppen müsste Tolclofos-methyl mit dem ABCG2-Transporter interagieren, jedoch konnte bis zur 10-fachen MRL-Konzentration keine signifikant erhöhte Farbstoffakkumulation im Hoechst-Assay detektiert werden.

*Tolclofos-methyl***Abb. 21 Strukturformel von Tolclofos-methyl.**

Insgesamt scheinen die Thesen von SZAFRANIEC et al. (2014) und TAYLOR et al. (2017) für die Vorhersage einer Interaktion der Pflanzenschutzmittel mit dem bovinen ABCG2-Transporter für den Großteil der gewählten Verbindungen gut geeignet zu sein. Die genannten Strukturgleichheiten beziehen sich jedoch auf den humanen ABCG2-Transporter. Um abschließend zu beweisen, dass die Molekülmerkmale der Substrate des humanen und bovinen ABCG2-Transporters übereinstimmen, sind theoretische Berechnungen nötig, die Bindungen möglicher Substrate am bovinen ABCG2-Transporter veranschaulichen. Leider steht bislang keine Struktur des bovinen ABCG2-Transporters für theoretische Rechnungen zur Verfügung.

Der indirekte Akkumulationsassay lässt keine Unterscheidung zwischen bABCG2-Substrat und Inhibitor zu (HEGEDUS et al. 2009, JANI et al. 2014). Um Stoffe eindeutig dem Substratspektrum zuzuordnen, sind Transportstudien wie Flux-Studien mit adäquater Analytik, wie z. B. von REAL et al. (2011), WASSERMANN et al. (2013a), MAHNKE et al. (2016) gezeigt, unerlässlich. Jedoch besteht hierbei die Schwierigkeit, die Pestizide in den niedrigen MRL-Konzentrationen ($< 1 \mu\text{M}$) zu quantifizieren. Darüber hinaus sind Transportstudien kostenintensiv und aufwendig (HEGEDUS et al. 2009). Um eine Vielzahl von Pflanzenschutzmitteln auf eine Interaktion mit dem bovinen ABCG2-Transporter zu untersuchen, bietet der Hoechst-Assay eine schnelle und kostengünstige Alternative. Durch den Vergleich der hier erhobenen Daten mit den Ergebnissen aus publizierten *In-vivo*-Fütterungsstudien soll im Folgenden versucht werden, potentielle bABCG2-Substrate zu identifizieren.

Das Insektizid Chlorpyrifos-methyl und das Fungizid Tebuconazol interagierten bereits ab 0,1-facher MRL-Konzentration (ab 6,2 nM, ab 32,5 nM) mit dem bABCG2-Transporter und könnten demnach als bABCG2-Substrate aktiv in die Milch sezerniert werden. Fütterungsstudien an Schafen und Ziegen belegen, dass durch die orale Aufnahme von Chlorpyrifos-methyl sowie Tebuconazol diese Verbindungen Rückstände in der Milch bilden

(EFSA 2008a, EFSA 2011c, EFSA 2011d). Leider gibt es für das Milchrind keine vergleichbaren Fütterungsstudien, jedoch konnten im Rahmen des Warenkorb-Monitorings 2012, 2013, 2015 und 2016 nicht quantifizierbare Mengen an Chlorpyrifos-methylrückständen in Butter- und Milchproben nachgewiesen werden (s. Tabelle A 2, S. 107, BVL 2014b, BVL 2015c, BVL 2016e, BVL 2017c). Auch Rückstände von Tebuconazol wurden zwischen 2014 und 2016 ebenfalls in nicht quantifizierbaren Mengen in Goudakäse, Butter und Milch detektiert (s. Tabelle A 2, S. 107, BVL 2016d, BVL 2016e, BVL 2017c). Aus den Daten des nationalen Warenkorb-Monitorings geht hervor, dass auch beim Rind Rückstände von Chlorpyrifos-methyl und Tebuconazol in Milch und Milchprodukten zu finden sind. Im Zusammenhang mit den hier vorgestellten Hoechst-Studien besteht die Möglichkeit, dass sowohl Chlorpyrifos-methyl als auch Tebuconazol aktiv über den bovinen ABCG2-Transporter in die Milch transportiert werden könnten.

In 1- und 10-facher MRL-Konzentration führten Diflufenican (25 nM, 250 nM) und Methiocarb (44 nM, 440 nM) zu einer starken, teilweise konzentrationsabhängigen Interaktion mit dem bovinen ABCG2-Transporter im Hoechst-Assay (s. Abb. 15). Metabolismusstudien mit laktierenden Rindern belegen, dass sich ein geringer Teil (0,1 – 0,2 %) der oral aufgenommenen Diflufenicanmenge in Milch und essbaren Geweben wiederfindet. Dabei dominiert Diflufenican in der Milch gegenüber seinen Metaboliten und erreicht nach drei Tagen die höchste Konzentration in der Milch (EFSA 2013b). Im Rahmen der Registrierung und Prüfung von Methiocarb für den australischen Markt im Jahr 2005 wurde auf eine von Bayer in Auftrag gegebene Studie von Minor und Murphy aus dem Jahr 1977 verwiesen. Die Autoren konnten in einer Fütterungsstudie mit laktierenden Rindern radioaktiv-markiertes Methiocarb in geringen Mengen (< 1 %) in der Milch detektieren (APVMA 2005). Diese Fütterungsstudien an Milchrindern zeigen, dass durch die orale Aufnahme von Diflufenican und Methiocarb Rückstände in der Milch verbleiben können. In Anbetracht der Ergebnisse des Hoechst-Akkumulationsassays (s. Abb. 15) könnten Diflufenican und Methiocarb bABCG2-vermittelt in die Milch transportiert werden. Jedoch konnten im Rahmen des Warenkorb-Monitorings weder Diflufenicanrückstände im Jahr 2016, noch Methiocarbrückstände von 2013 – 2016 in Milch und Milchprodukten gefunden werden (s. Tabelle A 2, S. 107, BVL 2015c, BVL 2016d, BVL 2016e, BVL 2017c). Es wäre möglich, dass Diflufenican und Methiocarb in die Milch transportiert werden, ohne das analytische Detektionslimit in der Milch zu überschreiten, sodass diese Verbindungen im Rahmen des Warenkorb-Monitorings nicht detektiert wurden. Zusätzlich muss darauf verwiesen werden, dass seit 2012 im Warenkorb-Monitoring lediglich einmal 11 Milchproben auf Diflufenicanrückstände untersucht wurden (s. Tabelle A 2, S. 107).

Die Untersuchungen auf Methiocarbrückstände in Milch und Milchprodukte erfolgten zwar beinahe jährlich, allerdings nur 12 bis 28 Proben pro Jahr (s. Tabelle A 2, S. 107). Somit bleibt fraglich, ob in diesem Fall die geringe Beprobungsintensität und der geringe Probenumfang (s. Tabelle A 2, S. 107) überhaupt einen adäquaten Rückschluss auf die tatsächliche Belastung ermöglichen. Es ist umso kritischer zu beurteilen, dass im nationalen Rückstandskontrollplan (NRKP) keine Beprobung auf Diflufenican- oder Methiocarbrückstände von 2012 – 2016 durchgeführt wurde (s. Tabelle A 1, S. 106).

Auch das Fungizid Prochloraz hemmte in 1- und 10-facher MRL-Konzentration (80 nM, 800 nM) die bABCG2-vermittelte Sekretion des Markersubstrates Hoechst 33342 (s. Abb. 15). Die Fütterungsstudien an laktierenden Rindern zeigen, dass nach oraler Aufnahme von Prochloraz (200 mg/kg Körpergewicht (KG) und Tag) Rückstände in Leber (2,8 mg/kg), Niere (0,52 mg/kg), Fettgewebe (0,16 mg/kg), Muskelgewebe (< 0,05 mg/kg) und Milch (0,05 mg/kg) nachweisbar sind (EFSA 2011a). Wie aus den Metabolismusstudien hervorgeht, wird Prochloraz intensiv metabolisiert (EFSA 2011a) und könnte die geringe Ausscheidung über die Milch erklären. Während im NRKP zwischen 2012 und 2016 keine Milchproben auf Prochlorazrückstände untersucht wurden (s. Tabelle A 1, S. 106), erfolgte ab 2013 eine zunehmende Untersuchung von Milch und Milchprodukten im Rahmen des Warenkorb-Monitorings (s. Tabelle A 2, S. 107). Zwischen 2014 und 2016 wurden Rückstände des Fungizids in Goudakäse, Butter und Kuhmilch in nicht quantifizierbaren Mengen nachgewiesen (BVL 2016d, BVL 2016e, BVL 2017c). Die *In-vivo*-Daten belegen, dass eine orale Aufnahme von Prochloraz zu Rückständen in der Milch führt. Der Nachweis der Interaktion mit dem bovinen ABCG2-Transporter liefert zusätzlich Hinweise, dass Prochloraz ein bABCG2-Substrat darstellt und demnach aktiv in die Milch sezerniert wird. Besonders interessant ist, dass Prochloraz intensiv metabolisiert wird und vermutlich erst in höheren Konzentrationen (1- und 10-fache MRL-Konzentration) als bABCG2-Substrat fungiert, aber dennoch in nicht quantifizierbaren Mengen im Warenkorb-Monitoring nachgewiesen wird.

Das Insektizid Thiacloprid verursachte ebenfalls in 1- und 10-facher MRL-Konzentration (198 nM und 1,98 µM) eine konzentrationsabhängige Steigerung der Farbstoff-Akkumulation im Hoechst-Assay (s. Abb. 15). Im Rahmen einer Metabolismusstudie an einer laktierenden Ziege konnte die radioaktiv-markierte Muttersubstanz Thiacloprid in allen Geweben und der Milch als Hauptmetabolit detektiert werden (EFSA 2014a). Darüber hinaus belegt die Fütterungsstudie an laktierenden Rindern, dass auch bei Milchrindern eine Elimination von Thiacloprid in die Milch erfolgt. So wurde bei einer täglichen Belastung mit 0,07 mg/kg KG,

0,22 mg/kg KG und 0,77 mg/kg KG am zweiten Tag die höchste Belastung der Milch mit durchschnittlich 0,02 mg/kg, 0,04 mg/kg und 0,13 mg/kg Thiaclopridrückständen ermittelt (EFSA 2014a). Auch im Warenkorb-Monitoring (2014 – 2016) konnten Rückstände des Insektizids in nicht quantifizierbaren Mengen sowohl in Milchprodukten (Goudakäse und Butter) als auch in Kuhmilch nachgewiesen werden (BVL 2016d, BVL 2016e, BVL 2017c). Die vorgestellten *In-vivo*-Studien verdeutlichen, dass nach der Aufnahme von Thiacloprid mit dem Futter Rückstände in allen tierischen Produkten zu erwarten sind. Eine Elimination in die Milch könnte hierbei, wie in den Hoechst-Studien gezeigt, über den bovinen ABCG2-Transporter erfolgen.

Auch die Herbizide Glyphosat und Rimsulfuron führten in 1- und 10-facher MRL-Konzentration (296 nM und 2,96 µM, 116 nM und 1,16 µM) zu einem reduzierten bABCG2-vermittelten Efflux des Hoechst-Farbstoffes (s. Abb. 15). Während Glyphosat eine konzentrationsabhängige Steigerung der Hoechst-Akkumulation verursachte (s. Abb. 15 A), wies Rimsulfuron eine gleichbleibende leichte Zunahme auf (s. Abb. 15 B). Jedoch konnten in zwei voneinander unabhängigen Fütterungsstudien keine Glyphosatrückstände in Milch nachgewiesen werden (EFSA 2015, VON SOOSTEN et al. 2016). Beide Studien beschreiben, dass die Hauptexkretion von Glyphosat über Faezes und Urin erfolgt, was dem hydrophilen Charakter (Log P –4,6, s. Tabelle A 3, S. 108) von Glyphosat entspricht (EFSA 2015, KIM et al. 2016, VON SOOSTEN et al. 2016). Laut SZAFRANIEC et al. (2014) und TAYLOR et al. (2017) werden als ABCG2-Substrate Moleküle mit sieben bis 20 Kohlenstoffatomen mit flacher räumlicher Konformation bevorzugt, die hydrophobe Regionen oder Aromaten beinhalten. Die Struktur von Glyphosat (s. Abb. 22) weist zwar eine flache Konformation auf, hat aber nur drei Kohlenstoffatome und keine hydrophoben Regionen, wodurch eine Affinität zur Bindungstasche des ABCG2-Transporters, wie unter 2.2.3 ausgeführt, unwahrscheinlich erscheint. Die Molekülstruktur und die fehlenden Nachweise von Glyphosatrückständen in der Milch könnten auf eine mögliche nicht-kompetitive Hemmung eines allosterischen Zentrums hinweisen. So gibt es Literaturhinweise, dass Stoffe außerhalb der Bindungstasche, z. B. an Arginin 482, binden und so die Substratspezifität des Transporters verändern (VELAMAKANNI et al. 2007, SZAFRANIEC et al. 2014, TAYLOR et al. 2017).

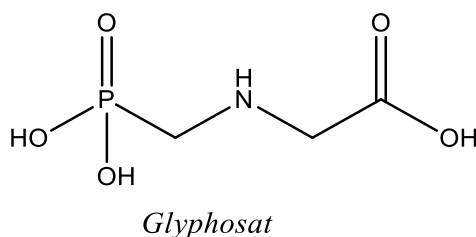


Abb. 22 Strukturformel von Glyphosat.

Obwohl Glyphosat und Rimsulfuron bereits im Jahr 2000 zu den zehn am häufigsten eingesetzten Herbiziden zählten (SCHMIDT und GUTSCHE 2000), wurden weder im Warenkorb-Monitoring noch im NRKP zwischen 2012 und 2016 Milch oder Milchprodukte auf Rückstände von Glyphosat oder Rimsulfuron überprüft (s. Tabelle A 1, S. 106 und Tabelle A 2, S. 107).

Die Einordnung von Rimsulfuron als bABCG2-Substrat oder Inhibitor gestaltet sich aufgrund fehlender *In-vivo*-Daten als schwierig. Laut einem EFSA Bericht (2005) ist für Rimsulfuron keine Ermittlung von MRL-Werten im Rahmen von Fütterungsstudien erforderlich, da gängige Futterpflanzen keine Rimsulfuronrückstände (< 0,05 mg/kg) aufweisen (EFSA 2005). Rimsulfuron besitzt jedoch 14 Kohlenstoffatome sowie eine flache, polyzyklische Struktur und erfüllt demnach die Kriterien von SZAFRANIEC et al. (2014) und TAYLOR et al. (2017) für eine Bindung in der postulierten Substratbindungstasche (s. Abb. A 2). Demnach könnte Rimsulfuron entweder ein bABCG2-Substrat sein oder aber ein kompetitiver Inhibitor, der Hoechst 33342 aus der Bindung verdrängt.

Ioxynil und Iprodion bewirken in 10-facher MRL-Konzentration (27 µM, 3,03 µM) einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Farbstoffgehalte durch die Interaktion mit dem Effluxtransporter. In Übereinstimmung zu den hier vorgestellten Ergebnissen, konnte auch in Fütterungsstudien eine konzentrationsabhängige Zunahme von Ioxynil- und Iprodionrückständen in der Milch beobachtet werden (EFSA 2009, EFSA 2013c). In einer Fütterungsstudie von Milchrindern mit Ioxyniloctanoat wurden jeweils am 7. Tag die höchsten Konzentrationen der Rückstände in der Milch detektiert. Bei einer Gabe von 0,014 mg/kg KG/Tag Ioxyniloctanoat mit dem Futter konnten am 7. Tag 0,01 mg/kg in der Milch ermittelt werden. Die Aufnahme der 10-fachen Konzentration (0,136 mg/kg KG/Tag) verursachte eine Verzehnfachung der Ioxynil-Rückstände (0,13 mg/kg) in der Milch (EFSA 2009).

Auch für Iprodion konnte im Rahmen einer Fütterungsstudie nachgewiesen werden, dass die Rückstände des Fungizids in der Milch mit zunehmender oraler Gabe ansteigen. Bei einer

Applikation von 0,180 mg/kg KG Iprodion pro Tag wurden im Durchschnitt 0,011 mg/kg Rückstände in der Milch laktierender Rinder wiedergefunden. In 10-facher Dosis (1,81 mg/kg KG/Tag) konnten im Durchschnitt 1,960 mg/kg Iprodionrückstände nachgewiesen werden (EFSA 2013c). Im Widerspruch dazu konnten im Warenkorb-Monitoring keine Rückstände von Iprodion in Milchprodukten (2012, 2013, 2015, 2016) detektiert werden (s. Tabelle A 2, S. 107, BVL 2014b, BVL 2015c, BVL 2016e, BVL 2017c). Dies könnte belegen, dass Rinder in geringen Maßen mit Iprodion exponiert werden, sodass die Rückstände in der Milch unterhalb des Detektionslimits liegen. Insgesamt konnte jedoch durch die Fütterungsstudien eindrucksvoll gezeigt werden, dass Ioxynil und Iprodion nach oraler Gabe zu Rückständen in der Milch führen. Im Zusammenhang mit den Hoechst-Studien könnte diese Anreicherung durch den bovinen ABCG2-Transporter erfolgen.

Die Insektizide Chlorpyrifos und Dimethoat, sowie die Fungizide Dimethomorph und Tolclofos-methyl (s. Abb. 15) führten zu keiner Beeinflussung der Farbstoffanreicherung im Hoechst-Assay innerhalb der gemessenen 0,1- bis 10-fachen MRL-Konzentration. Diese Ergebnisse stimmen, mit Ausnahme von Chlorpyrifos, mit den beschriebenen Fütterungsstudien überein. So konnten in zwei Untersuchungen mit laktierenden Schafen und Ziegen keine Dimethoatrückstände in der Milch detektiert werden (TSIPLAKOU et al. 2010, EFSA 2013a). Die Autoren vermuteten, dass Dimethoat aufgrund seiner Wasserlöslichkeit (Log P 0,8, s. Tabelle A 3, S. 108) vorrangig über Urin und Faezes ausgeschieden wird und daher kaum in fettreicher Milch akkumulieren kann (TSIPLAKOU et al. 2010, KIM et al. 2016). Auch im Rahmen des Warenkorb-Monitorings wurden zwischen 2013 und 2016 keine Dimethoatrückstände in Milch-, Goudakäse- oder Butterproben nachgewiesen (s. Tabelle A 2, S. 107, BVL 2015c, BVL 2016d, BVL 2016e, BVL 2017c).

Auch für Dimethomorph und Tolclofos-methyl konnten im Rahmen von Metabolismusstudien keine Rückstände in Ziegenmilch detektiert werden (EFSA 2011b, EFSA 2014b). Weder für Dimethomorph noch für Tolclofos-methyl wurden Rückstände in Milch- oder Milchprodukten zwischen 2012 und 2016 nachgewiesen (s. Tabelle A 2, S. 107, BVL 2014b, BVL 2015c, BVL 2016e, BVL 2017c). Trotz der möglichen speziesspezifischen Unterschiede im Substratspektrum könnten diese Daten darauf hinweisen, dass Dimethoat, Dimethomorph und Tolclofos-methyl weder bABCG2-vermittelt, noch andersweitig bei Schafen, Ziegen oder Rindern in der Milch angereichert werden.

Im Widerspruch zu der hier fehlenden Interaktion mit dem bovinen ABCG2-Transporter konnte Chlorpyrifos im Warenkorb-Monitoring in Butter- und Milchproben (2012, 2013, 2015, 2016)

in nicht quantifizierbaren Mengen nachgewiesen werden (s. Tabelle A 2, S. 107, BVL 2014b, BVL 2015c, BVL 2016e, BVL 2017c). Auch einige weitere Autoren zeigten eine Anreicherung mit Chlorpyrifos in Milch- und Milchprodukten, wie Sahne (MCKELLAR et al. 1976, PAGLIUCA et al. 2006, BEDI et al. 2015, JAWAID et al. 2016). Chlorpyrifos weist von allen Substanzen den höchsten Verteilungskoeffizienten (Log P 5,3, s. Tabelle A 3, S. 108) auf, was die von MCKELLAR et al. (1976) beschriebene starke Lipophilie der Substanz unterstreicht (KIM et al. 2016). Aufgrund der starken Lipophilie könnte Chlorpyrifos passiv über Diffusion in die Milch gelangen. Der Nachweis der Diffusion ist mit dem hier vorgestellten Hoechst-Assay jedoch nicht möglich. Denkbar wäre ein HPLC gestützter Nachweis von Chlorpyrifos im Rahmen von Flux-Studien. Dies widersprach jedoch dem Ansatz, eine kostengünstige Hochdurchsatzmethode zu etablieren und wurde demnach nicht weitergehend untersucht. Das Insektizid Chlorpyrifos stellt nach den hier erhobenen Daten kein Substrat des bovinen ABCG2-Transporters dar. Jedoch lassen die *In-vivo*-Nachweise von Chlorpyrifos in Milch und Milchprodukten eine mögliche passive Diffusion in die Milch vermuten.

Durch den Vergleich der Daten aus dem Hoechst 33342-Assay mit den Strukturgleichheiten typischer ABCG2-Substrate, sowie den Daten aus den Fütterungsstudien konnten Chlorpyrifos-methyl, Diflufenican, Ioxynil, Iprodion, Methiocarb, Prochloraz, Tebuconazol und Thiacloprid als mögliche Substrate des bovinen ABCG2-Transporters identifiziert werden. Davon scheinen insbesondere Chlorpyrifos-methyl, Diflufenican, Methiocarb, Prochloraz, Tebuconazol und Thiacloprid auch unterhalb der gesetzlich festgelegten Höchstgrenzen (MRL-Konzentration) in die Milch transportiert zu werden. Das Insektizid Chlorpyrifos zählt wahrscheinlich aufgrund seiner Molekülstruktur und der fehlenden Interaktion im Hoechst 33342-Assay nicht zu den bABCG2-Substraten. Dennoch zeigen *In-vivo*-Untersuchungen, dass nach oraler Aufnahme von Chlorpyrifos Rückstände in der Milch verbleiben, sodass ein anderer Transportmechanismus von Bedeutung sein könnte. Für Glyphosat und Rimsulfuron wurde im Akkumulationsassay eine Interaktion mit dem bABCG2-Transporter nachgewiesen. Aufgrund fehlender Vergleichsdaten konnten diese Wirkstoffe weder als Substrat noch als Inhibitor eindeutig zugeordnet werden.

Der Vergleich mit den Strukturgleichheiten, Fütterungsstudien, Daten aus dem NRKP sowie nationalem Warenkorb-Monitoring ist bei vorhandenen Interaktionen im Hoechst-Assay gut dazu geeignet, um potentielle bABCG2-Substrate zu identifizieren. Hingegen sind diese Daten unzureichend, um Nicht-Interakteure oder Inhibitoren des mammären Effluxtransporters genauer zu charakterisieren. Denn ein fehlender Nachweis der Rückstände in Milchproben

bedeutet nicht zwangsläufig eine fehlende bABCG2-Interaktion. Die Rückstände könnten auch unterhalb des Detektionslimits liegen. Insgesamt bleibt zu berücksichtigen, dass zwischen 2012 und 2016 nur 4 der 14 ausgewählten Pflanzenschutzmittel überhaupt im NRKP untersucht wurden (s. Tabelle A 1, S. 106). Vor allem Glyphosat und Rimsulfuron wurden in diesem Zeitraum weder im NRKP noch im Warenkorb-Monitoring untersucht (s. Tabelle A 1, S. 106 und Tabelle A 2, S. 107). Demnach ermöglichen diese Daten nur bedingt Rückschlüsse auf eine Belastung der Milchproben mit den ausgewählten Pflanzenschutzmitteln.

5.4 Wechselwirkungen von Pestiziden am bABCG2-Transporter

Mehr als ein Drittel aller Lebensmittel sind mit Rückständen von mehr als einem Pflanzenschutzmittel (Mehrfachrückstände) belastet (BVL 2018a). Es ist davon auszugehen, dass auch milchlieferende Wiederkäuer einer Belastung mit mehreren Pestizidrückständen ausgesetzt sind.

Im Jahr 1983 wurde erstmalig die Wechselwirkung von Arzneimitteln an Transportern beschrieben (BELZ et al. 1983, SCHINKEL et al. 1995). Dabei verursachte eine kombinierte Anwendung der Antiarrhythmika Verapamil und Digoxin einen Anstieg der Digoxinplasmakonzentration, die auf eine Wechselwirkung am ABCB1-Transporter (P-Glykoprotein, MDR-1) zurückgeführt werden konnte (BELZ et al. 1983, HUNTER et al. 1993, SCHINKEL et al. 1995, CAVET et al. 1996). Im Hinblick auf den ABCG2-Transporter wurde der Einfluss von Flavonoiden auf die Pharmakokinetik von Arzneimitteln bereits gut untersucht (BIRCSAK und ALEKSUNES 2015). So konnte an laktierenden Schafen gezeigt werden, dass sowohl Genistein als auch Albendazolsulfoxid die Sekretion des ABCG2-Substrates Enrofloxacin in die Milch limitieren (PULIDO et al. 2006). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass diätetisch aufgenommene Isoflavone, Daidazein und Genistein, die ABCG2-vermittelte Elimination von Nitrofurantoin sowie Danofloxacin in die Milch reduzieren (PEREZ et al. 2009a, PEREZ et al. 2013). Während die Isoflavone Daidazein und Genistein ovine ABCG2-Inhibitoren darstellen, beeinflussen auch ABCG2-Substrate den Efflux von veterinärmedizinisch-relevanten Arzneimitteln am bovinen ABCG2-Transporter. Für das laktierende Rindereuter konnten MAHNKE et al. (2016) am MDCKII-bABCG2-Zellmodell belegen, dass die bABCG2-Substrate Enrofloxacin, Oxfendazol sowie Moxidectin den Efflux von Monepantelsulfon, einem weiteren bABCG2-Substrat, vermindern.

Der ABCG2-Transporter beeinflusst, insbesondere an der Blut-Milch-Schranke, die Pharmakokinetik von Arzneimitteln (ITC 2010). Durch Interaktionen von

Mehrfachpestizidrückständen mit dem bovinen ABCG2-Transporter könnte der Transport von ABCG2-Substraten in die Milch verändert werden. Ziel dieser Studien war die Identifikation möglicher synergistischer oder antagonistischer Effekte von Mehrfachrückständen auf den bABCG2-vermittelten Fremdstofftransport im Rindereuter. Dafür wurde der Einfluss zweier gleichzeitig applizierter Pestizidwirkstoffe (s. Tabelle 4, S. 47) auf die ABCG2-vermittelte Hoechst-Akkumulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowie zur Einzelpestizidinkubation betrachtet (s. 3.2.5).

Eine im Hoechst-Assay detektierte erhöhte intrazelluläre Fluoreszenz kennzeichnet eine reduzierte bABCG2-Transportrate des Markersubstrates Hoechst 33342. Diese Transportrate kann durch ein Pflanzenschutzmittel reduziert werden, indem diese Verbindung selbst als Substrat transportiert wird oder als Inhibitor den bABCG2-Transporter hemmt. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, dass Pestizide untereinander am Effluxtransporter wechselwirken und so den Hoechst-Efflux verändern. Dabei wird in der Literatur vor allem die Rolle unterschiedlicher Bindungsstellen in der Substratbindungstasche des ABCG2-Transporters hervorgehoben (NI et al. 2010). Das Vorhandensein multipler Bindungsstellen in den TMD des humanen ABCG2-Transporters wurde bereits 1992 von HIGGINS beschrieben. NI et al. (2010) fasste verschiedene Studien zusammen, die ebenfalls unterschiedliche Bindungsstellen in der Bindungstasche des Transportproteins favorisieren. Während die ABCG2-Substrate Doxorubicin, Prazosin und Daunomycin die Transportrate des Markersubstrates reduzierten, wurde diese durch Rhodamin 123 und Methotrexat nicht beeinflusst. Die Autoren schlussfolgerten, dass Doxorubicin, Prazosin und Daunomycin an der gleichen Stelle binden wie das Markersubstrat. Dadurch wird das Markersubstrat aus der Substratbindungstasche verdrängt und die Transportrate limitiert. Ähnliche Effekte konnten auch für die ausgewählten Pestizidkombinationen beobachtet werden.

Pestizide, die im Warenkorb-Monitoring häufig gemeinsam in Lebensmitteln detektiert werden, führten bei kombinierter Anwendung zu unterschiedlichen Effekten. So konnte für die beiden potentiellen bABCG2-Substrate (s. 5.3), Methiocarb und Chlorpyrifos-methyl, bei kombinierter Anwendung eine Zunahme der Hoechst-Akkumulation im Vergleich zu den Einzelstoffen beobachtet werden (s. Abb. 16 A). Dies könnte auf eine Bindung der beiden Insektizide an unterschiedliche Bindungsstellen im bovinen ABCG2-Transporter zurückzuführen sein. Denn beide Einzelstoffe verursachen eine Reduktion des Hoechst-Effluxes, der bei gleichzeitiger Applikation weiter abnimmt. Würden die beiden Insektizide um

die gleiche Stelle in der postulierten Bindungstasche konkurrieren, würde bei gleichzeitiger Applikation keine weitere Reduktion des Hoechst-Effluxes erfolgen.

Bei gleichzeitiger Inkubation von Glyphosat mit Chlorpyrifos-methyl wurde keine Veränderung der Hoechst-Akkumulation gegenüber der Einzelpestizidinkubation beobachtet (s. Abb. 16 B). Beide Substanzen zeigten jedoch bei alleiniger Inkubation eine Interaktion mit dem bABCG2-Transporter (s. 5.3). Womöglich binden Glyphosat und Chlorpyrifos-methyl in der Bindungstasche des Carriers an die gleiche Bindungsstelle, sodass sie sich gegenseitig verdrängen und bei gleichzeitiger Anwesenheit den Hoechst-Efflux nicht stärker beeinflussen als einzeln.

Die ebenfalls im Warenkorb kodetekierte Fungizide Dimethomorph und Iprodion zeigten im Hoechst-Assay weder allein noch in Kombination in eine Interaktion mit dem bABCG2-Transporter (MELUND 2012). Dies bestätigt die Annahme, dass Dimethomorph und Iprodion unterhalb des 1-fachen MRL-Wertes keine Interaktion mit dem Transporter aufweisen (s. 5.3).

Das im Handel erhältliche Kombinationspräparat, bestehend aus Prochloraz und Tebuconazol (BVL 2014c), führte nicht zu einer signifikanten Zunahme der Hoechst-Akkumulation gegenüber der Einzelpestizidinkubation (s. Abb. 17 A). Beide Fungizide stellen potentielle Substrate des mammären bABCG2-Transporters dar (s. 5.3). Bei kombinierter Inkubation konnte eine Abnahme der Hoechst-Akkumulation gegenüber Tebuconazol, jedoch nicht im Vergleich zu Prochloraz, ermittelt werden. Wie bereits für Glyphosat und Chlorpyrifos-methyl gezeigt (s. Abb. 16 B), könnten auch hier Prochloraz und Tebuconazol in Konkurrenz um eine Bindungsstelle in der Bindungstasche des ABCG2-Transporters stehen und daher keine weitere Hemmung des Hoechst-Efflux verursachen. Anscheinend ist die Affinität von Prochloraz zur möglichen gemeinsamen Bindungsstelle stärker als die von Tebuconazol, sodass das Ausmaß der Hemmung des Hoechst-Efflux bei gleichzeitiger Applikation der alleinigen Inkubation von Prochloraz entspricht.

Ioxynil und Diflufenican sind im Handel unter dem Präparatenamen „Azur“ bekannt (BVL 2014c). Obwohl beide Fungizide potentielle bABCG2-Substrate darstellen, ist nur Diflufenican in der Lage, in 1-facher MRL-Konzentration mit dem bABCG2-Transporter zu interagieren (s. 5.3). Bei gleichzeitiger Inkubation von Ioxynil und Diflufenican in 1-facher MRL-Konzentration konnte keine weitere Zunahme des intrazellulären Farbstoffes gegenüber der Einzelpestizidinkubation beobachtet werden (s. Abb. 17 B). Ioxynil weist vermutlich eine geringere Affinität zum Transporter auf, sodass Interaktionen erst in höheren Konzentrationen detektiert werden können (s. 5.3). Demnach ist der in Abb. 17 B dargestellte Effekt der

Pestizidkombination möglicherweise auf die alleinige Substratwirkung von Diflufenican zurückzuführen.

Mais ist insbesondere für milchliefernde Rinder eine bedeutsame Futterpflanze, daher wurde die Kombination von Glyphosat und Rimsulfuron, die für den Maisanbau empfohlen wird, im Hoechst-Assay näher untersucht (JEROCH et al. 1999, KUHLMANN 2014). In 1-facher MRL-Konzentration konnte bei gleichzeitiger Inkubation mit den zwei Herbiziden ein ansteigender Trend der Hoechst-Akkumulation gegenüber der Einzelpestizidinkubation detektiert werden (s. Abb. 18). Die gleichzeitige Applikation von Glyphosat und Rimsulfuron verursachte in 10-facher MRL-Konzentration eine synergistische Reduktion des Hoechst-Efflux gegenüber der alleinigen Inkubation mit den Herbiziden. Im Rahmen der Untersuchungen zur Interaktion der einzelnen Wirkstoffe konnte weder Glyphosat noch Rimsulfuron eindeutig als Substrat oder Inhibitor klassifiziert werden (s. 5.3). Für Rimsulfuron konnte aufgrund fehlender *In-vivo*-Daten nur eine Affinität zur Substratbindungstasche postuliert werden. Die detektierten synergistischen Effekte der beiden Herbizide und die theoretischen Überlegungen aus 5.3 könnten auf eine Bindung an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen im bABCG2-Transporter hinweisen, die jeweils den Hoechst 33342-Efflux beeinflussen. Wie bereits für Methiocarb und Chlorpyrifos-methyl beschrieben, würde eine Konkurrenz um die gleiche Bindungsstelle in der Substratbindungstasche des bABCG2-Transporters keine synergistischen Effekte auf den Hoechst-Efflux verursachen, während eine Affinität zu unterschiedlichen Stellen synergistische Effekte zur Folge haben könnte. Insgesamt kann jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob Rimsulfuron und Glyphosat Substrate oder Inhibitoren des bABCG2-Transporters darstellen.

Anhand der untersuchten Pestizidkombinationen konnte festgestellt werden, dass für potentielle ABCG2-Substrate, wie Methiocarb und Chlorpyrifos-methyl, innerhalb der gesetzlich festgelegten Höchstgrenzen synergistische Effekte detektiert werden können. Für die Herbizide Glyphosat und Rimsulfuron konnte ein konzentrationsabhängiger, synergistischer Einfluss auf die bABCG2-Transportaktivität gezeigt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sich potentielle bABCG2-Substrate, wie Prochloraz und Tebuconazol, aufgrund unterschiedlicher Affinitäten am bABCG2-Transporter gegenseitig verdrängen und daher keine synergistischen Effekte hervorrufen. Substanzen, die keine Interaktion mit dem Transporter aufwiesen, hatten auch in Kombination keinen Einfluss auf die bABCG2-Transportaktivität. Abschließende Beweise für diese Hypothesen könnten nur durch Flux-Studien oder Docking-Studien erbracht werden. Jedoch ist dies aufgrund der fehlenden, ausreichend sensitiven Analytik und fehlender speziesspezifischer Modelle für theoretische Berechnungen bislang nicht möglich.

5.5 Risiken potentieller bABCG2-Substrate

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass verschiedene Pflanzenschutzmittel mit dem bovinen ABCG2-Transporter interagieren und somit bABCG2-vermittelt in die Milch sezerniert werden könnten. Wie aus Tabelle A 1 (S. 106) und Tabelle A 2 (S. 107) hervorgeht, unterschreiten Pestizidrückstände in Milch- und Milchprodukten i. d. R. die gesetzlich festgelegten MRL-Werte. Sie können zwar häufig detektiert, aber nicht quantifiziert werden. Daher sind diese Rückstände in der Milch für den Verbraucher zwar nicht akut toxisch, können jedoch durch chronische Belastung, z. B. als endokrine Disruptoren, die Gesundheit der Konsumenten beeinträchtigen (HAMILTON et al. 2004, PAUDYAL 2008). Es ist bekannt, dass folgende, in dieser Arbeit als bABCG2-Substrate klassifizierten, Pflanzenschutzmittel zu den endokrinen Disruptoren gehören: Chlorpyrifos-methyl (ZIDAN 2009, JUBERG et al. 2013), Prochloraz (VINGGAARD et al. 2006, OHLSSON et al. 2009), Methiocarb (BIRKHØJ et al. 2004), Tebuconazol (TAXVIG et al. 2007, RIEKE et al. 2014) und Thiacloprid (CARON-BEAUDOIN et al. 2016, CARON-BEAUDOIN et al. 2017). Auch für das Herbizid Diflufenican gibt es erste Hinweise, dass es den Hormonhaushalt beeinflusst (EFSA 2008b). Diese endokrinen Disruptoren sind in niedrigen Konzentrationen in der Lage, den Hormonhaushalt zu stören und chronische Erkrankungen hervorzurufen (EWENCE et al. 2015). So konnte an laktierenden Mäusen nachgewiesen werden, dass nach der oralen Gabe von Chlorpyrifos in geringen Konzentrationen das Gewicht der Nachkommen, sowie das Gewicht deren Leber und Nieren reduziert war (MANSOUR und MOSSA 2010). Auch wenn in den hier vorgestellten Hoechst-Studien Chlorpyrifos keine Interaktion mit dem bovinen ABCG2-Transporter zeigte, wird aus der Studie von MANSOUR und MOSSA (2010) deutlich, dass eine Exposition der Muttertiere zu einer gesundheitlichen Beeinflussung der Nachkommen durch Pestizidrückstände in der Milch führen kann. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit, die geringen Beprobungen von Milch und Milchprodukten auf Pestizidrückstände im Rahmen des NRKP sowie Warenkorb-Monitorings (s. Tabelle A 1, S. 106 und Tabelle A 2, S. 107) zu überdenken.

Weiterhin konnte am Beispiel von Methiocarb und Chlorpyrifos-methyl belegt werden, dass auch Pestizide am bABCG2-Transporter wechselwirken und zu synergistischen Effekten führen. Hierbei ist insbesondere zu beachten, dass der ABCG2-Transporter die Pharmakokinetik von Arzneimitteln beeinflusst (ITC 2010). Durch die Wechselwirkungen von Pflanzenschutzmitteln kann daher die Kinetik von Fremdstoffen verändert werden, die sowohl unerwartete Arzneimittelwirkungen als auch eine vermehrte Anreicherung von Rückständen in der Milch verursachen könnten.

6 Zusammenfassung

Lydia Kuhnert

MDCKII-bABCG2-Zellen: ein Modell zur Abschätzung der Anreicherung von Pflanzenschutzmitteln in der Milch

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

Eingereicht im Dezember 2018

83 Seiten, 22 Abbildungen, 4 Tabellen, 234 Literaturangaben, 5 Anhänge

Schlüsselwörter: boviner ABCG2/BCRP-Transporter, MDCKII-Zellen, Hoechst 33342-Assay, Pflanzenschutzmittel, Milch

Einleitung

Der intensive Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in der konventionellen Landwirtschaft kann zum Eintrag von Rückständen in die Nahrungskette führen. Milchliefernde Rinder nehmen Pflanzenschutzmittelrückstände mit dem Futter auf, die durch aktive Sekretion in die Milch eine Gefährdung für sensible Bevölkerungsgruppen, wie Kinder, verursachen könnten. Die in nationalen Rückstandskontrollen untersuchten Milchproben unterschreiten zwar in der Regel die gesetzlich festgelegten Höchstgrenzen (Maximum Residue Level, MRL), jedoch kann eine andauernde Belastung mit Pflanzenschutzmitteln die Entstehung chronischer Erkrankungen, wie Morbus Parkinson und Kinderleukämie, fördern.

Im Rindereuter stellt der ATP-binding cassette Transporter der Subfamilie G2 (ABCG2) den wichtigsten Transportweg für Fremdstoffe in die Milch dar. Mit seinem breiten Substratspektrum ist der bovine ABCG2-Transporter (bABCG2) in der Lage, unterschiedliche Substrate in die Kuhmilch zu transportieren. Jedoch ist bislang unklar, ob auch Pflanzenschutzmittel bABCG2-vermittelt in die Milch sezerniert werden können und ob die gleichzeitige Aufnahme mehrerer Rückstände die bABCG2-Effluxaktivität beeinflusst.

Ziele der Untersuchungen

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Pflanzenschutzmitteln als mögliche Substrate des bovinen Effluxtransporters. Weiterhin wurde untersucht, ob zwischen zwei Wirkstoffen synergistische oder antagonistische Effekte am bABCG2-Transporter auftreten.

Material und Methoden

Es wurden 14 häufig in der konventionellen Landwirtschaft eingesetzte Pflanzenschutzmittel in 0,1-, 1- und 10-facher MRL-Konzentration, in Bezug auf essbare Gewebe von Rindern, untersucht. Weiterhin wurden sechs Kombinationen aus jeweils zwei Wirkstoffen ausgewählt. Im WST-1 (Water Soluble Tetrazolium 1) Assay wurden MDCKII-bABCG2-Zellen in aufsteigender Konzentration mit den Pflanzenschutzmitteln inkubiert (72 h) und die Zellvitalität ermittelt. Nach Inkubation der MDCKII-bABCG2- und MDCKII-Mock-Zellen mit den ausgewählten Pflanzenschutzmitteln oder den Kombinationen (4 h) wurde der Hoechst 33342-Akkumulationsassay durchgeführt. Dabei führt eine Interaktion des Pflanzenschutzmittels mit dem bABCG2-Transporter zu einer intrazellulären Anreicherung des Hoechst 33342-Farbstoffes. Für die Identifikation signifikanter Unterschiede wurden jeweils mindestens zwölf Monolayer auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) überprüft und eine Einweg-Varianzanalyse mit Holm-Šidák post hoc Test ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Ergebnisse

Nachdem eine Beeinträchtigung der Zellvitalität durch die ausgewählten Pflanzenschutzmittel in 0,1- bis 10-facher MRL-Konzentration ausgeschlossen wurde, konnte im Hoechst 33342-Assay für Chlorpyrifos-methyl und Tebuconazol ab 0,1-facher MRL-Konzentration eine signifikante Zunahme der intrazellulären Hoechst 33342-Gehalte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Für Diflufenican, Glyphosat, Methiocarb, Prochloraz, Rimsulfuron sowie Thiacloprid konnte in 1- und 10-facher MRL-Konzentration und für Iprodion sowie Ioxynil in 10-facher MRL-Konzentration eine signifikant erhöhte Hoechst 33342-Anreicherung detektiert werden. Darüber hinaus führte eine gleichzeitige Applikation von Methiocarb und Chlorpyrifos-methyl in 1-facher MRL-Konzentration, sowie von Glyphosat und Rimsulfuron in 10-facher MRL-Konzentration zu einer synergistischen Steigerung der Farbstoffakkumulation.

Schlussfolgerung

Es konnte festgestellt werden, dass das MDCKII-Zellmodell in Kombination mit dem Hoechst 33342-Assay eine valide Methode darstellt, um Wechselwirkungen einzelner und kombinierter Pflanzenschutzmittel zu detektieren. Insgesamt konnten unterhalb gesetzlich festgelegter MRL-Werte acht Pflanzenschutzmittel als potentielle bABCG2-Substrate identifiziert, sowie additive Effekte von Wirkstoffkombinationen nachgewiesen werden. Durch die Aufnahme von Pflanzenschutzmitteln mit dem Futter könnten diese aktiv in die Milch sezerniert werden und somit eine Gefahr für den Verbraucher darstellen.

7 Summary

Lydia Kuhnert

The MDCKII-bABCG2 cell line: assessment of pesticide accumulation in dairy milk

Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig.

Submitted in December 2018

83 pages, 22 figures, 4 tables, 234 references, 5 appendices

Keywords: bovine ABCG2/BCRP transporter, MDCKII cell line, Hoechst 33342 assay, pesticide, milk

Introduction

The conventional use of pesticides can lead to residues in feed and exposes cattle through diet. If these residues accumulate in dairy milk a risk for consumers, especially vulnerable persons like children, is given. In monitoring programs, pesticides are frequently detected in milk samples below permitted MRL (Maximum Residue Level) values. A long-term exposure to low level pesticide residues is known to provoke chronic diseases, like Morbus Parkinson and childhood leukemia.

In the bovine mammary gland, the ATP-binding cassette transporter subfamily G2 (ABCG2) represents the main route of xenobiotic elimination into milk. It is also known that some veterinary drugs are actively secreted by the bovine ABCG2 (bABCG2) transporter, but little information is available about pesticide accumulation in dairy milk. Furthermore, less is known about interactions between pesticides and their impact on the bABCG2 efflux activity.

Aims

The aim of this study was to identify whether certain pesticides act as potential bABCG2 substrates. Additionally, the interactions of pesticide combinations were investigated.

Materials and Methods

In order to investigate the interaction of pesticides with the bovine ABCG2 transporter, 14 frequently used pesticides and six pesticide combinations, each with two different substances, were selected. First, MDCKII-bABCG2 cells were incubated with increasing concentrations of the selected pesticides (72 h) and the cytotoxicity of the substances was ruled out by WST-1

Summary

(Water Soluble Tetrazolium 1) assay. Afterwards, MDCKII-bABCG2 and MDCKII-Mock cells were incubated with the pesticides for four hours and the Hoechst 33342 accumulation assay was performed. An ABCG2 interaction results in an elevated intracellular accumulation of the Hoechst dye due to inhibition of the ABCG2-mediated efflux of the dye. Applied concentrations corresponded to the 0.1-, 1- and 10-fold maximum residue levels (MRLs) permitted in ruminant tissues. At least twelve monolayers were proved for normality (Shapiro-Wilk test) and significant differences were assessed by One-Way-ANOVA with Holm-Šidák post hoc test (≤ 0.05).

Results

In the WST-1 assay no cytotoxic effects of the pesticides were observed at 0.1- up to 10-fold MRL concentrations. Chlorpyrifos-methyl and tebuconazole, at 0.1-fold MRL, showed a significant increase of intracellular Hoechst accumulation. The 1- and 10-fold MRL concentrations of diflufenican, glyphosate, methiocarb, prochloraz, rimsulfuron and thiacloprid elevated the intracellular amount of the dye in a significant manner. Iprodion and ioxynil caused a significant increase of Hoechst 33342 at 10-fold MRL concentration. Concurrent cell incubation with 1-fold MRL concentrations of methiocarb and chlorpyrifos-methyl led to an additive, inhibitory effect on bABCG2-mediated Hoechst 33342 efflux. A similar effect was observed for 10-fold MRL concentrations of glyphosate and rimsulfuron.

Conclusion

In summary, the MDCKII-bABCG2 cell line in combination with the Hoechst 33342 assay is a suitable *in vitro* model to assess the potential accumulation of single and multiple pesticide residues in dairy milk. This study identified eight of the 14 selected pesticides as potential substrates of the bABCG2 transporter below approved MRL concentrations. Moreover, for pesticide combinations additive effects on the bABCG2 efflux activity were detected. Thus, pesticide residues could be actively secreted into dairy milk, which could result in a risk for consumers.

8 Literaturverzeichnis

- Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(14):1213-21.
- Ahmed-Belkacem A, Pozza A, Macalou S, Pérez-Victoria JM, Boumendjel A, Di Pietro A. Inhibitors of cancer cell multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Anticancer Drugs*. 2006;17(3):239-43.
- Al Antary TM, Alawi MA, Estityah H, Haddad N. Organochlorine pesticides residues in human breast milk from the middle governorates in Jordan in 2013/2014. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2017;99(1):89-92.
- Allen JD, Brinkhuis RF, Wijnholds J, Schinkel AH. The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res*. 1999;59(17):4237-41.
- Allen JD, van Loevezijn A, Lakhai JM, van der Valk M, van Tellingen O, Reid G, et al. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther*. 2002;1(6):417-25.
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res*. 1998;58(23):5337-9.
- Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, Enver T, Ashworth A, Vivanco MD, et al. Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Res*. 2003;5(1):R1-8.
- Assaraf YG. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat*. 2006;9(4-5):227-46.
- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA) 2005. The reconsideration of methiocarb, registrations of products containing methiocarb and their associated labels. Volume 2: preliminary review findings. Technical report Part A-D (zitiert vom 14.03.2018) 1-176, <<https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14666-methiocarb-preliminary-review-findings.pdf>>.
- Aust S, Obrist P, Jaeger W, Klimpfinger M, Tucek G, Wrba F, et al. Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium. *Lab Invest*. 2004;84(8):1024-36.

- Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, Ross DD. Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1520(3):234-41.
- Ballent M, Viviani P, Imperiale F, Dominguez P, Halwachs S, Mahnke H, et al. Pharmacokinetic assessment of the monepantel plus oxfendazole combined administration in dairy cows. *J Vet Pharmacol Ther*. 2018;41(2):292-300.
- Bedi JS, Gill JP, Aulakh RS, Kaur P. Pesticide residues in bovine milk in Punjab, India: spatial variation and risk assessment to human health. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2015;69(2):230-40.
- Belz GG, Doering W, Munkes R, Matthews J. Interaction between digoxin and calcium antagonists and antiarrhythmic drugs. *Clin Pharmacol Ther*. 1983;33(4):410-7.
- Bircsak KM, Richardson JR, Aleksunes LM. Inhibition of human MDR1 and BCRP transporter ATPase activity by organochlorine and pyrethroid insecticides. *J Biochem Mol Toxicol*. 2013;27(2):157-64.
- Bircsak KM, Aleksunes LM. Interaction of isoflavones with the BCRP/ABCG2 drug transporter. *Curr Drug Metab*. 2015;16(2):124-40.
- Birkhøj M, Nellemann C, Jarfelt K, Jacobsen H, Andersen HR, Dalgaard M, Vinggaard AM. The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;201(1):10-20.
- Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:537-92.
- Bucher S, Le Vee M, Jouan E, Fardel O. Regulation of hepatic drug transporter activity and expression by organochlorine pesticides. *J Biochem Mol Toxicol*. 2014;28(3):119-28.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2005. Hintergrundinformation: Mehrfachrückstände von Pflanzenschutzmitteln in und auf Lebensmitteln (zitiert vom 13.03.2018) 1-5, <https://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/01_Lebensmittel/2005/2005_11_09_hi_MehrfachrueckstPSM_Nov05.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2012. Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2011. Monitoring: Gemeinsamer Bericht des Bundes und der Länder (zitiert vom 03.02.2016) 1-97, <https://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/04_Monitoring/lm_monitoring_Berichte_Archiv/lm_monitoring_Berichte_Archiv_node.html>.

- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2013a. Absatz an Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland. Ergebnisse der Meldungen gemäß § 64 Pflanzenschutzgesetz für das Jahr 2012 (zitiert vom 02.03.2016) 1-17, <www.bvl.bund.de/psmstatistiken>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2013b. Liste der zugelassenen Pflanzenschutzmittel in Deutschland mit Informationen über beendete Zulassungen (Stand: April 2013) (zitiert vom 12.09.2017) 1-110, <www.bvl.bund.de/infopsm>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2013c. Tabellen I bis III der Ergebnisse des Nationalen Rückstandskontrollplans 2012 (zitiert vom 06.07.2018) 1-63, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/08_nrkp_euep/Anl_1_Internet_NRKP_2012_I-III.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2014a. Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2012. Monitoring: Gemeinsamer Bericht des Bundes und der Länder (zitiert vom 03.02.2016) 1-108, <http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/04_Publikationen/03_Berichte/infothek_berichte_node.html#doc1401838bodyText1>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2014b. Tabellenband zum Monitoring 2012 (zitiert vom 09.07.2018) 1-10, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/01_lm_mon_dokumente/02_Monitoring_Tabellen/archiv/lm_monitoring__tabellen_table.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2014c. Liste der zugelassenen Pflanzenschutzmitteln in Deutschland mit Informationen über beendete Zulassungen (Stand: Oktober 2014) (zitiert vom 12.09.2017) 1-119, <www.bvl.bund.de/infopsm>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2015a. Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2013. Monitoring: Gemeinsamer Bericht des Bundes und der Länder (zitiert vom 03.02.2016) 1-106, <http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/04_Publikationen/03_Berichte/infothek_berichte_node.html#doc1401838bodyText1>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2015b. Tabellen I bis III der Ergebnisse des Nationalen Rückstandskontrollplans 2013 (zitiert vom 06.07.2018) 1-99, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/08_nrkp_euep/nrkp2013_tabellen.html>.

- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2015c. Tabellenband zum Monitoring 2013 (zitiert vom 09.07.2018) 1-8, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/01_lm_mon_dokumente/02_Monitoring_Tabellen/archiv/lm_monitoring__tabellen_table.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2015d. Tabellen I bis III der Ergebnisse des Nationalen Rückstandskontrollplans 2014 (zitiert vom 06.07.2018) 1-95, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/08_nrkp_euep/nrkp2014_tabellen.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2016a. Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2014. Monitoring: Gemeinsamer Bericht des Bundes und der Länder (zitiert vom 03.02.2016) 1-122, <http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/04_Publikationen/03_Berichte/infothek_berichte_node.html#doc1401838bodyText1>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2016b. Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2015. Monitoring: Gemeinsamer Bericht des Bundes und der Länder (zitiert vom 07.07.2018) 1-122, <https://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/04_Publikationen/03_Berichte/infothek_berichte_node.html#doc1401838bodyText1>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2016c. Pflanzenschutzmittel-Rückstände auf Lebensmitteln (zitiert vom 04.09.2017) 1-2, <http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/02_Verbraucher/02_PSM_Rueckstaende_LM/psm_PSMRueckstaendeLM_node.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2016d. Tabellenband zum Monitoring 2014 (zitiert vom 09.07.2018) 1-10, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/01_lm_mon_dokumente/02_Monitoring_Tabellen/archiv/lm_monitoring__tabellen_table.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2016e. Tabellenband zum Monitoring 2015 (zitiert vom 09.07.2018) 1-10, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/01_lm_mon_dokumente/02_Monitoring_Tabellen/archiv/lm_monitoring__tabellen_table.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2017a. Absatz an Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland. Ergebnisse der Meldungen gemäß § 64 Pflanzenschutzgesetz für das Jahr 2016 (zitiert vom 21.02.2018) <www.bvl.bund.de/psmstatistiken>.

- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2017b. Rückstandshöchstegehalte: Listen und Rechtsgrundlagen (zitiert vom 04.09.2017) 1-2, <http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/01_Aufgaben/07_Rueckstaende/Hoechstgehalte/03_ListenRechtsgrundlagen/psm_Regelungen_zu_Hoechstmengen_nod e.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2017c. Tabellenband zum Monitoring 2016 (zitiert vom 09.07.2018) 1-11, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/01_lm_mon_dokumente/02_Monitoring_Tabellen/archiv/lm_monitoring__tabellen_table.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2018a. Pflanzenschutzmittelrückstände in Lebensmitteln. Nationale Berichterstattung 2016 der Bundesrepublik Deutschland - Kurzfassung (zitiert vom 13.03.2018) 1-8, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/nbpsm/NBPSMR_2016.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2018b. Tabelle der Ergebnisse des NRKPs und EÜPs 2015 (zitiert vom 06.07.2018) 1-52, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/08_nrkp_euep/nrk p2015_tabellen.html>.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2018c. Tabelle der Ergebnisse des NRKPs und EÜPs 2016 (zitiert vom 06.07.2018) 1-400, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/08_nrkp_euep/nrk p2016_tabellen.html>.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2015. Fragen und Antworten zu Pflanzenschutzmittelrückständen in Lebensmitteln (zitiert vom 04.03.2016) 1-9, <<http://www.bfr.bund.de/de/pflanzenschutzmittelrueckstaende-10196.html>>.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2018a. Mehrfachrückstände von Pflanzenschutzmitteln (zitiert vom 13.03.2018) 1-2, <http://www.bfr.bund.de/de/mehrfachrueckstaende_von_pflanzenschutzmitteln-195079.html>.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2018b. Rechtliche Grundlagen im Bereich Pflanzenschutzmittel (zitiert vom 28.02.2018) 1-3, <http://www.bfr.bund.de/de/rechtliche_grundlagen_im_bereich_pflanzenschutzmittel-70203.html>.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen (Pflanzenschutzgesetz - PflSchG) vom 06. Feb. 2012. BGBl. I S. 148, 1281 (18. Jul. 2016).

- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) 2014. Rückstände von Pflanzenschutzmitteln. Gesundheit geht vor (zitiert vom 04.09.2017) 1-16, <http://www.bmel.de/DE/Ernaehrung/SichereLebensmittel/RueckstaendeKontaminanten/RueckstaendeKontaminanten_node.html>.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2017. Auswertung der Rückstandsdaten von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen in Lebensmitteln und Bewertung gesundheitlicher Risiken für Verbraucher auf Basis des Monitorings 2009-2014 (zitiert vom 13.03.2018) 1-9, <https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Rueckstaende/Bericht_PSM-Rueckstaende_Exposition.pdf?__blob=publicationFile>.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) 2018. Pflanzenschutz. Die wichtigsten rechtlichen Regelungen im Pflanzenschutz (zitiert vom 28.02.2018) 1-4, <https://www.bmel.de/DE/Landwirtschaft/Pflanzenbau/Pflanzenschutz/_Texte/Pflanzenschutzbestimmungen.html>.
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV). Verordnung über Zulassungs- und Genehmigungsverfahren für Pflanzenschutzmittel (Pflanzenschutzmittelverordnung - PflSchMV) vom 15. Jan. 2013. BGBl. S. 74 (15. Jan. 2013).
- Bundestag der Bundesrepublik Deutschland. Gesetz über den Verkehr mit DDT (DDT-Gesetz) vom 07. Aug. 1972. BGBl. 82 (10. Aug. 1972).
- Bundestag der Bundesrepublik Deutschland. Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz - GenTG) vom 16. Dez. 1993. BGBl. I S. 2066 (17. Jul. 2017).
- Caron-Beaudoin É, Denison MS, Sanderson JT. Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression and activity of aromatase (CYP19) in human adrenocortical carcinoma (H295R) and primary umbilical vein endothelial (HUVEC) cells. *Toxicol Sci.* 2016;149(1):134-44.
- Caron-Beaudoin É, Viau R, Hudon-Thibeault AA, Vaillancourt C, Sanderson JT. The use of a unique co-culture model of fetoplacental steroidogenesis as a screening tool for endocrine disruptors. The effects of neonicotinoids on aromatase activity and hormone production. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;332:15-24.
- Cavet ME, West M, Simmons NL. Transport and epithelial secretion of the cardiac glycoside, digoxin, by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br J Pharmacol.* 1996;118(6):1389-96.

- Chedik L, Bruyere A, Bacle A, Potin S, Le Vée M, Fardel O. Interactions of pesticides with membrane drug transporters: implications for toxicokinetics and toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2018;14(7):739-52.
- Chen P, Chen H, Zang X, Chen M, Jiang H, Han S, Wu X. Expression of efflux transporters in human ocular tissues. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(11):1934-48.
- Cohen-Zinder M, Seroussi E, Larkin DM, Loo JJ, Everts-van der Wind A, Lee JH, et al. Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res.* 2005;15(7):936-44.
- Darko G, Acquah SO. Levels of organochlorine pesticides residues in dairy products in Kumasi, Ghana. *Chemosphere.* 2008;71(2):294-8.
- de Bruin M, Miyake K, Litman T, Robey R, Bates SE. Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett.* 1999;146(2):117-26.
- Denison MS, Heath-Pagliuso S. The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1998;61(5):557-68.
- Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:309-34.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(26):15665-70. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(5):2569.
- Ebert B, Seidel A, Lampen A. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis.* 2005;26(10):1754-63.
- EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). Scientific Opinion on the identification of pesticides to be included in cumulative assessment groups on the basis of their toxicological profile. *EFSA Journal* 2013;11(7):3293.
- Europäische Kommission. Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Liste zugelassener Wirkstoffe Text von Bedeutung für den EWR (DVO (EG) 540/2011) vom 25. Mai 2011. ABl. EU L 153 (11.06.2011).

- Europäische Kommission. Verordnung (EU) Nr. 283/2013 zur Festlegung der Datenanforderungen für Wirkstoffe gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln (VO (EU) 283/2013) vom 01. März 2013. ABl. EU L 93 (03. Apr. 2013).
- Europäisches Parlament, Europäischer Rat. Verordnung (EG) Nr. 850/2004 über persistente organische Schadstoffe und zur Änderung der Richtlinie 79/117/EWG (VO (EG) 850/2004) vom 29. Apr. 2004. ABl. EU L 158 (30. Apr. 2004).
- Europäisches Parlament, Europäischer Rat. Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates (VO (EG) 1107/2009) vom 21. Okt. 2009. ABl. EU L 309 (24. Nov. 2009).
- Europäisches Parlament, Europäischer Rat. Verordnung (EG) Nr. 1185/2009 über Statistiken zu Pestiziden (VO (EU) 1185/2009) vom 25. Nov. 2009. ABl. EU L 324 (10. Dez. 2009).
- Europäisches Parlament, Europäischer Rat. Verordnung (EU) Nr. 528/2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten (VO (EU) 528/2012) vom 22. Mai 2012. ABl. EU L 167 (27. Jun. 2012).
- Europäisches Parlament, Europäischer Rat. Verordnung (EG) Nr. 396/2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs und zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG des Rates (VO (EG) 396/2005) vom 23. Feb. 2005. ABl. EU L 70 (16. März 2005).
- European chemicals agency (ECHA), European Food Safety Authority (EFSA) 2018. Outline of draft guidance document for the implementation of the hazard-based criteria to identify endocrine disruptors - Update on time planning for finalisation and endorsement of the guidance document (zitiert vom 15.03.2018) 1-3, <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/documents/news/180117_ed_guidance_outline.pdf>.
- European Commission (COM) 2008. Factsheet. New rules on pesticide residues in food (zitiert vom 07.03.2016) 1-4, <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/eu_rules/index_en.htm>.
- European Commission (COM) 2015a. EU Pesticide Database. Search active substances (zitiert vom 12.09.2017) <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>>.

- European Commission (COM) 2015b. EU Pesticide Database. Search pesticide residues (zitiert vom 04.09.17) <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>>.
- European Commission (COM) 2016. Pesticides (zitiert vom 03.03.2016) <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/index_en.htm>.
- European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance rimsulfuron. EFSA Journal 2005(45):1-61.
- European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance methiocarb. EFSA Journal 2006(79):1-82.
- European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion on pesticide peer review. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebuconazole. EFSA Journal 2008a;176:1-109.
- European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance diflufenican. EFSA Journal 2008b;122(2):1-84.
- European Food Safety Authority (EFSA). reasoned opinion of EFSA. Modification of the existing MRLs for ioxynil in several food commodities of animal origin. EFSA Journal 2009(288):1-28.
- European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion on pesticide peer review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance prochloraz. EFSA Journal 2011a;9(7):2323.
- European Food Safety Authority (EFSA). Modification of the existing MRLs for dimethomorph in various commodities. EFSA Journal 2011b;9(5):2165.
- European Food Safety Authority (EFSA). Reasoned opinion. Modification of the existing MRLs for chlorpyrifos-methyl in various crops. EFSA Journal 2011c;9(6):2219.
- European Food Safety Authority (EFSA). Review of the existing maximum residue levels (MRLs) for tebuconazole according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA Journal 2011d;9(8):2339.
- European Food Safety Authority (EFSA). Modification of the existing MRLs for chlorpyrifos in various crops and in products of animal origin. EFSA Journal 2012;10(1):2510.
- European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of confirmatory data submitted for the active substance dimethoate. EFSA Journal 2013a;11(7):3233.

- European Food Safety Authority (EFSA). Reasoned opinion. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for diflufenican according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA Journal 2013b;11(6):3281.
- European Food Safety Authority (EFSA). Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for iprodione according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA Journal 2013c;11(10):2947.
- European Food Safety Authority (EFSA). Reasoned Opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for thiacloprid according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA Journal 2014a;12(3):3617.
- European Food Safety Authority (EFSA). Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for tolclofos-methyl according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA Journal 2014b;12(12):3920.
- European Food Safety Authority (EFSA). The 2012 European Union Report on pesticide residues in food. EFSA Journal 2014c;12(12):3942.
- European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. EFSA Journal 2015;13(11):4302.
- European Medicines Agency (EMA), Committee for Human Medicinal Products (CHMP) 2012. Guideline on the investigation of drug interactions. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2 .
- European Medicines Agency (EMA), Committee for Human Medicinal Products (CHMP) 2017. Concept paper on a revision of the Guideline on the investigation of drug interactions. EMEA/CHMP/694687/2016 .
- Ewence A, Brescia S, Johnson I, Rumsby PC. An approach to the identification and regulation of endocrine disrupting pesticides. Food Chem Toxicol. 2015;78:214-20.
- Fetsch PA, Abati A, Litman T, Morisaki K, Honjo Y, Mittal K, Bates SE. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. Cancer Lett. 2006;235(1):84-92.
- Fletcher JI, Williams RT, Henderson MJ, Norris MD, Haber M. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. Drug Resist Updat. 2016;26:1-9.
- Galea KS, MacCalman L, Jones K, Cocker J, Teedon P, Cherrie JW, van Tongeren M. Urinary biomarker concentrations of captan, chlormequat, chlorpyrifos and cypermethrin in UK adults and children living near agricultural land. J Expo Sci Environ Epidemiol. 2015;25(6):623-31.

- Gerosa S, Skoet J, Agriculture development economics division 2012. Milk availability Trends in production and demand and medium-term outlook (zitiert vom 14.03.2018) <<http://www.fao.org/publications/card/en/c/64f300d3-2b39-5729-b4b1-4438c5f77dd2>>.
- González-Lobato L, Real R, Herrero D, de la Fuente A, Prieto JG, Marqués MM, et al. Novel in vitro systems for prediction of veterinary drug residues in ovine milk and dairy products. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2014;31(6):1026-37.
- Graeve L, Müller M. Biomembranen. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Aufl. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer 2014. p. 149–56.
- Haller S, Schuler F, Lazic SE, Bachir-Cherif D, Krämer SD, Parrott NJ, et al. Expression profiles of metabolic enzymes and drug transporters in the liver and along the intestine of beagle dogs. Drug Metab Dispos. 2012;40(8):1603-10.
- Halwachs S, Wassermann L, Lindner S, Zizzadoro C, Honscha W. Fungicide prochloraz and environmental pollutant dioxin induce the ABCG2 transporter in bovine mammary epithelial cells by the arylhydrocarbon receptor signaling pathway. Toxicol Sci. 2013;131(2):491-501.
- Halwachs S, Wassermann L, Honscha W. A novel MDCKII in vitro model for assessing ABCG2-drug interactions and regulation of ABCG2 transport activity in the caprine mammary gland by environmental pollutants and pesticides. Toxicol In Vitro. 2014;28(3):432-41.
- Halwachs S, Schäfer I, Kneuer C, Seibel P, Honscha W. Assessment of ABCG2-mediated transport of pesticides across the rabbit placenta barrier using a novel MDCKII in vitro model. Toxicol Appl Pharmacol. 2016a;305:66-74.
- Halwachs S, Kneuer C, Gohlsch K, Müller M, Ritz V, Honscha W. The ABCG2 efflux transporter from rabbit placenta: Cloning and functional characterization. Placenta. 2016b;38:8-15.
- Hamilton D, Ambrus A, Dieterle R, Felsot A, Harris C, Petersen B, et al. Pesticide residues in food - acute dietary exposure. Pest Manag Sci. 2004;60(4):311-39.
- Hasanabady MH, Kalalinia F. ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer. J Biosci. 2016;41(2):313-24.
- Hediger MA, Romero MF, Peng J-B, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. Pflugers Arch 2004;447(5):465-8.

- Hediger MA, Cl  men  on B, Burrier RE, Bruford EA. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol Aspects Med.* 2013;34:95-107.
- Heged  s C, Szak  cs G, Homolya L, Orb  n TI, Telbisz   , Jani M, Sarkadi B. Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: an update on in vitro functional assays. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(1):47-56.
- Heise T, Schmidt F, Knebel C, Rieke S, Haider W, Geburek I, et al. Hepatotoxic combination effects of three azole fungicides in a broad dose range. *Arch Toxicol.* 2018;92(2):859-72.
- Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:67-113.
- Huls M, Brown CD, Windass AS, Sayer R, van den Heuvel JJ, Heemskerk S, et al. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney Int.* 2008;73(2):220-5.
- Hunter J, Hirst BH, Simmons NL. Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharm Res.* 1993;10(5):743-9.
- Hussain SZ, Strom SC, Kirby MR, Burns S, Langemeijer S, Ueda T, et al. Side population cells derived from adult human liver generate hepatocyte-like cells in vitro. *Dig Dis Sci.* 2005;50(10):1755-63.
- International Transporter Consortium (ITC). Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3):215-36.
- Jacobsen PR, Christiansen S, Boberg J, Nellemann C, Hass U. Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats. *Int J Androl.* 2010;33(2):434-42.
- Jani M, Ambrus C, Magnan R, Jakab KT, Be  ry E, Zolnerciks JK, Krajcsi P. Structure and function of BCRP, a broad specificity transporter of xenobiotics and endobiotics. *Arch Toxicol.* 2014;88(6):1205-48.
- Jawaid S, Talpur FN, Nizamani SM, Khaskheli AA, Afridi HI. Multipesticide residue levels in UHT and raw milk samples by GC-  ECD after QuEChER extraction method. *Environ Monit Assess.* 2016;188(4):230.
- Jeroch H, Drochner W, Simon O. Ern  hrung landwirtschaftlicher Nutztiere: Ern  hrungsphysiologie, Futtermittelkunde, F  tterung; 200 Tabellen. 2. Aufl. UTB f  r Wissenschaft Gro  e Reihe. Stuttgart: Ulmer 1999.

- Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH, Schinkel AH. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(20):1651-6.
- Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, van der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, et al. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(24):15649-54.
- Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, et al. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med.* 2005;11(2):127-9.
- Juberg DR, Gehen SC, Coady KK, LeBaron MJ, Kramer VJ, Lu H, Marty MS. Chlorpyrifos. Weight of evidence evaluation of potential interaction with the estrogen, androgen, or thyroid pathways. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2013;66(3):249-63.
- Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976;455(1):152-62.
- Juvalle K, Stefan K, Wiese M. Synthesis and biological evaluation of flavones and benzoflavones as inhibitors of BCRP/ABCG2. *Eur J Med Chem.* 2013;67:115-26.
- Kage K, Fujita T, Sugimoto Y. Role of Cys-603 in dimer/oligomer formation of the breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2. *Cancer Sci.* 2005;96(12):866-72.
- Kerr ID, Haider AJ, Gelissen IC. The ABCG family of membrane-associated transporters. You don't have to be big to be mighty. *Br J Pharmacol.* 2011;164(7):1767-79.
- Khaniki JGR. Chemical contaminants in milk and public health concerns: a review. *Int J Dairy Sci.* 2007;2(2):104-15.
- Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, et al. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res.* 2002;8(1):22-8.
- Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D1202-13.
- Kuhlmann J 2014. Unkrautbekämpfung in Mais 2014 (zitiert vom 24.10.2014) <<http://www.lwk-niedersachsen.de/index.cfm/portal/pflanze/nav/506/article/24684.html>>.
- Lechner A, Leech CA, Abraham EJ, Nolan AL, Habener JF. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(2):670-4.

- Leggas M, Panetta JC, Zhuang Y, Schuetz JD, Johnston B, Bai F, et al. Gefitinib modulates the function of multiple ATP-binding cassette transporters in vivo. *Cancer Res.* 2006;66(9):4802-7.
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;204(3):216-37.
- Lewis KA, Tzilivakis J, Warner DJ, Green A. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum Ecol Risk Assess.* 2016;22(4):1050-64.
- Liebich HG. Funktionelle Histologie. Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere; mit 4 Tabellen. Stuttgart, New York: Schattauer 1990.
- Lindner S, Halwachs S, Wassermann L, Honscha W. Expression and subcellular localization of efflux transporter ABCG2/BCRP in important tissue barriers of lactating dairy cows, sheep and goats. *J Vet Pharmacol Ther.* 2013;36(6):562-70.
- Long M, Laier P, Vinggaard AM, Andersen HR, Lynggaard J, Bonefeld-Jørgensen EC. Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. *Toxicology.* 2003;194(1-2):77-93.
- Mackowiak B, Wang H. Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1859(9):1130-40.
- Mahnke H, Ballent M, Baumann S, Imperiale F, von Bergen M, Lanusse C, et al. The ABCG2 efflux transporter in the mammary gland mediates veterinary drug secretion across the blood-milk barrier into milk of dairy cows. *Drug Metab Dispos.* 2016;44(5):700-8.
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 2001;61(8):3458-64.
- Mallatou H, Pappas CP, Kondyli E, Albanis TA. Pesticide residues in milk and cheeses from Greece. *Sci Total Environ.* 1997;196(2):111-7.
- Mansour SA, Mossa AH. Adverse effects of lactational exposure to chlorpyrifos in suckling rats. *Hum Exp Toxicol.* 2010;29(2):77-92.
- Manzini L, Halwachs S, Girolami F, Badino P, Honscha W, Nebbia C. Interaction of mammary bovine ABCG2 with AFB1 and its metabolites and regulation by PCB 126 in a MDCKII in vitro model. *J Vet Pharmacol Ther.* 2017;40(6):591-8.
- Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J.* 2005;7(1):E118-33.

- Mao Q, Unadkat JD. Role of Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport - an update. *AAPS J.* 2015;17(1):65-82.
- Marx-Stoelting P, Niemann L, Ritz V, Ulbrich B, Gall A, Hirsch-Ernst KI, et al. Assessment of three approaches for regulatory decision making on pesticides with endocrine disrupting properties. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014;70(3):590-604. Erratum in: *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015;72:256.
- McEwen SA, McNab WB. Contaminants of non-biological origin in foods from animals. *Rev Sci Tech.* 1997;16(2):684-93.
- McKellar RL, Dishburger HJ, Rice JR, Craig LF, Pennington J. Residues of chlorpyrifos, its oxygen analogue, and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in milk and cream from cows fed chlorpyrifos. *J Agric Food Chem.* 1976;24(2):283-6.
- McManaman JL, Neville MC. Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(5):629-41.
- Mealey KL. ABCG2 transporter. Therapeutic and physiologic implications in veterinary species. *J Vet Pharmacol Ther.* 2012;35(2):105-12.
- Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, van Herwaarden AE, Schinkel AH. The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol.* 2005a;67(5):1758-64.
- Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, Pulido MM, Molina AJ, Alvarez AI, Schinkel AH. Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metab Dispos.* 2005b;33(5):614-8.
- Merino G, Perez M, Real R, Egido E, Prieto JG, Alvarez AI. In vivo inhibition of BCRP/ABCG2 mediated transport of nitrofurantoin by the isoflavones genistein and daidzein: a comparative study in *Bcrp1* (-/-) mice. *Pharm Res.* 2010;27(10):2098-105.
- Meyer zu Schwabedissen HE, Kroemer HK. In vitro and in vivo evidence for the importance of breast cancer resistance protein transporters (BCRP/MXR/ABCP/ABCG2). In: Fromm MF, Kim RB, Hrsg. *Drug Transporters. Handbook of Experimental Pharmacology.* Vol 201. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011. p. 325–71.
- Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung (MELUND) 2012. Pestizide in pflanzlichen Lebensmitteln. Ausführliche Übersicht über die Untersuchungsergebnisse des Jahres 2011 (zitiert vom 03.02.2016) <<https://www.schleswig-holstein.de/DE/Fachinhalte/L/lebensmittel/pestizide.html>>.

- Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells. Demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 1999;59(1):8-13.
- Mostafalou S, Abdollahi M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;268(2):157-77.
- Nag SK, Raikwar MK. Organochlorine pesticide residues in bovine milk. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2008;80(1):5-9.
- Nagy I, Tóth B, Gáborik Z, Erdo F, Krajcsi P. Membrane transporters in physiological barriers of pharmacological importance. *Curr Pharm Des.* 2016;22(35):5347-72.
- Nakanishi T, Ross DD. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). Its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer.* 2012;31(2):73-99.
- Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(8):1084-103.
- Nieke F. Beeinflussung der intestinalen Folatresorption durch Umweltkontaminanten am Beispiel eines humanen in vitro Modells [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig 2014.
- Niemann L. Biozide und Pflanzenschutzmittel aus Sicht der Lebensmittelsicherheit. In: Leipziger Blaue Hefte (LBH), Rackwitz R, Hrsg. 7. Leipziger Tierärztekongress: Tagungsband 3. Leipziger Blaue Hefte. Vol 3; Leipzig. Berlin: Lehmanns Media GmbH; Lehmanns 2014. p. 423–26.
- Nishihashi K, Kawashima K, Nomura T, Urakami-Takebayashi Y, Miyazaki M, Takano M, Nagai J. Cobalt chloride induces expression and function of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in human renal proximal tubular epithelial cell line HK-2. *Biol Pharm Bull.* 2017;40(1):82-7.
- Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005;20(6):452-77.
- Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, Mao Q. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr Drug Metab.* 2010;11(7):603-17.
- Ntzani EE, Ntritsos G CM, Evangelou E, Tzoulaki I. Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. *EFSA Supporting Publications* 2013;10(10):515.

- Oh H, Chi X, Bradfute SB, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, et al. Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells. *Ann NY Acad Sci.* 2004;1015:182-9.
- Ohlsson A, Ullerås E, Oskarsson A. A biphasic effect of the fungicide prochloraz on aldosterone, but not cortisol, secretion in human adrenal H295R cells - underlying mechanisms. *Toxicol Lett.* 2009;191(2-3):174-80.
- Ohlsson A, Cedergreen N, Oskarsson A, Ullerås E. Mixture effects of imidazole fungicides on cortisol and aldosterone secretion in human adrenocortical H295R cells. *Toxicology.* 2010;275(1-3):21-8.
- Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T, et al. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(47):18700-5.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals - section 5 part A. Introduction to OECD test guidelines on pesticide residues chemistry. Other test guidelines, 5 Part A. Paris, France: OECD Publishing 2013.
- Otero JA, Miguel V, González-Lobato L, García-Villalba R, Espín JC, Prieto JG, et al. Effect of bovine ABCG2 polymorphism Y581S SNP on secretion into milk of enterolactone, riboflavin and uric acid. *Animal.* 2016a;10(02):238-47.
- Otero JA, García-Mateos D, de la Fuente A, Prieto JG, Álvarez AI, Merino G. Effect of bovine ABCG2 Y581S polymorphism on concentrations in milk of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin. *J Dairy Sci.* 2016b;99(7):5731-8.
- Pagliuca G, Serraino A, Gazzotti T, Zironi E, Borsari A, Rosmini R. Organophosphorus pesticides residues in italian raw milk. *J Dairy Res.* 2006;73(03):340-4.
- Pardío VT, Waliszewski KN, Landín LA, Bautista RG. Organochlorine pesticide residues in cow's milk from a tropical region of Mexico. *Food Addit Contam.* 2003;20(3):259-69.
- Paudyal BP. Organophosphorus poisoning. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2008;47(172):251-8.
- Peña-Solórzano D, Stark SA, König B, Sierra CA, Ochoa-Puentes C. ABCG2/BCRP: specific and nonspecific modulators. *Med Res Rev.* 2017;37(5):987-1050.
- Perez M, Blazquez AG, Real R, Mendoza G, Prieto JG, Merino G, Alvarez AI. In vitro and in vivo interaction of moxidectin with BCRP/ABCG2. *Chem Biol Interact.* 2009a;180(1):106-12.
- Perez M, Real R, Mendoza G, Merino G, Prieto JG, Alvarez AI. Milk secretion of nitrofurantoin, as a specific BCRP/ABCG2 substrate, in assaf sheep: modulation by isoflavones. *J Vet Pharmacol Ther.* 2009b;32(5):498-502.

- Perez M, Otero JA, Barrera B, Prieto JG, Merino G, Alvarez AI. Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep. *Vet J.* 2013;196(2):203-8.
- Pestizid Aktions-Netzwerk e.V. (PAN Germany) 2012. Pestizide und Gesundheitsfragen. Daten und Fakten (zitiert vom 07.06.2018) <<https://pan-germany.org/download/pesticides-and-health-hazards-facts-and-figures/>>.
- Pirsaheb M, Limoe M, Namdari F, Khamutian R. Organochlorine pesticides residue in breast milk: a systematic review. *Med J Islam Repub Iran.* 2015;29:228.
- Polgar O, Robey RW, Bates SE. ABCG2. Structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(1):1-15.
- Potschka H, Zellinger C, Rentsch R, Ammer H. Pestizidvergiftungen. In: Leipziger Blaue Hefte (LBH), Hrsg. 8. Leipziger Tierärztekongress: Tagungsband 1. Leipziger Blaue Hefte. Vol 1; Leipzig. Berlin: Lehmanns Media GmbH 2015. p. 498–500.
- Puga A, Ma C, Marlowe JL. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(4):713-22.
- Pulido MM, Molina AJ, Merino G, Mendoza G, Prieto JG, Alvarez AI. Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 2006;29(4):279-87.
- Ramirez CJ, Minch JD, Gay JM, Lahmers SM, Guerra DJ, Haldorson GJ, et al. Molecular genetic basis for fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats. *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21(2):66-75.
- Real R, Gonzalez-Lobato L, Baro MF, Valbuena S, de la Fuente A, Prieto JG, et al. Analysis of the effect of the bovine adenosine triphosphate-binding cassette transporter G2 single nucleotide polymorphism Y581S on transcellular transport of veterinary drugs using new cell culture models. *J Anim Sci.* 2011;89(12):4325-38.
- Reuter W 2012. Mehrbelastungen durch Pestizide auf Mensch und Umwelt (zitiert vom 06.04.2017) 1-67, <<https://www.greenpeace.de/themen/landwirtschaft/pestizide/pestizide-lebensmitteln-und-deren-auswirkungen>>.
- Rieke S, Koehn S, Hirsch-Ernst K, Pfeil R, Kneuer C, Marx-Stoelting P. Combination effects of (tri)azole fungicides on hormone production and xenobiotic metabolism in a human placental cell line. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11(9):9660-79.
- Rieke S, Heise T, Schmidt F, Haider W, Bednarz H, Niehaus K, et al. Mixture effects of azole fungicides on the adrenal gland in a broad dose range. *Toxicology.* 2017;385:28-37.

- Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, Bates SE. ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(1):3-13.
- Rode HJ 2008. Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation. 4. Aufl. (zitiert vom 03.10.2016) 1–186, <https://www.lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001_05.08.pdf>.
- Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters. Participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev.* 2006;86(4):1179-236.
- Scharenberg CW, Harkley MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood.* 2002;99(2):507-12.
- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest.* 1995;96(4):1698-705.
- Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(1):3-29.
- Schmidt HH, Gutsche V. Analyse der Entwicklung des Pflanzenschutzmittel-Absatzes in der Bundesrepublik Deutschland im Zeitraum 1980 bis 1998. *Gesunde Pflanzen* 2000;52(6):172-82.
- Schricks JA, Fink-Gremmels J. Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products. *Eur J Pharmacol.* 2008;585(2-3):510-9.
- Sharma HR, Kaushik A, Kaushik CP. Pesticide residues in bovine milk from a predominantly agricultural state of Haryana, India. *Environ Monit Assess.* 2007;129(1-3):349-57.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85. Erratum in: *Anal Biochem.* 1987;163(1):279.
- Sobotta J, Welsch U. Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie: mit 823 Abbildungen und 21 Tabellen. 2. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer 2006.
- Stelwagen K, Singh K. The role of tight junctions in mammary gland function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2014;19(1):131-8.
- Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22644-9.

- Szafraniec MJ, Szczygieł M, Urbanska K, Fiedor L. Determinants of the activity and substrate recognition of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug Metab Rev.* 2014;46(4):459-74.
- Szakács G, Váradi A, Özvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today.* 2008;13(9-10):379-93.
- Tamaki H, Satoh H, Hori S, Ohtani H, Sawada Y. Inhibitory effects of herbal extracts on breast cancer resistance protein (BCRP) and structure-inhibitory potency relationship of isoflavonoids. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2010;25(2):170-9.
- Taxvig C, Hass U, Axelstad M, Dalgaard M, Boberg J, Andeasen HR, Vinggaard AM. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol Sci.* 2007;100(2):464-73.
- Taylor NMI, Manolaridis I, Jackson SM, Kowal J, Stahlberg H, Locher KP. Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature.* 2017;546(7659):504-9.
- Tirona RG. Molecular mechanism of drug transporter regulation. In: Fromm MF, Kim RB, Hrsg. *Drug Transporters. Handbook of Experimental Pharmacology.* Vol 201. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011. p. 373–401.
- Tsakiris IN, Kokkinakis E, Dumanov JM, Tzatzarakis MN, Flouris AD, Vlachou M, Tsatsakis AM. Comparative evaluation of xenobiotics in human and dietary milk: persistent organic pollutants and mycotoxins. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2013;59(1):58-66.
- Tsiplakou E, Anagnostopoulos CJ, Liapis K, Haroutounian SA, Zervas G. Pesticides residues in milks and feedstuff of farm animals drawn from Greece. *Chemosphere.* 2010;80(5):504-12.
- Tucker TG, Milne AM, Fournel-Gigleux S, Fenner KS, Coughtrie MW. Absolute immunoquantification of the expression of ABC transporters P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein 2 in human liver and duodenum. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(2):279-85.
- Tydén E, Bjornstrom H, Tjälve H, Larsson P. Expression and localization of BCRP, MRP1 and MRP2 in intestines, liver and kidney in horse. *J Vet Pharmacol Ther.* 2010;33(4):332-40.
- Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(3):864-73.
- van Herwaarden AE, Wagenaar E, Karnekamp B, Merino G, Jonker JW, Schinkel AH. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary

- carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis*. 2006;27(1):123-30.
- van Herwaarden AE, Schinkel AH. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(1):10-6.
- Velamakanni S, Wei SL, Janvilisri T, van Veen HW. ABCG transporters. Structure, substrate specificities and physiological roles: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr*. 2007;39(5-6):465-71.
- Vinggaard AM, Hass U, Dalgaard M, Andersen HR, Bonefeld-Jørgensen E, Christiansen S, et al. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *Int J Androl*. 2006;29(1):186-92.
- von Soosten D, Meyer U, Hüther L, Dänicke S, Lahrssen-Wiederholt M, Schafft H, et al. Excretion pathways and ruminal disappearance of glyphosate and its degradation product aminomethylphosphonic acid in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2016;99(7):5318-24.
- Wassermann L, Halwachs S, Baumann D, Schaefer I, Seibel P, Honscha W. Assessment of ABCG2-mediated transport of xenobiotics across the blood-milk barrier of dairy animals using a new MDCKII in vitro model. *Arch Toxicol*. 2013a;87(9):1671-82.
- Wassermann L, Halwachs S, Lindner S, Honscha KU, Honscha W. Determination of functional ABCG2 activity and assessment of drug-ABCG2 interactions in dairy animals using a novel MDCKII in vitro model. *J Pharm Sci*. 2013b;102(2):772-84.
- World Health Organization (WHO) 1997. Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues (zitiert vom 13.03.2018) <<http://www.who.int/foodsafety/publications/pesticides/en/>>.
- Xu J, Peng H, Chen Q, Liu Y, Dong Z, Zhang JT. Oligomerization domain of the multidrug resistance-associated transporter ABCG2 and its dominant inhibitory activity. *Cancer Res*. 2007;67(9):4373-81.
- Yagdiran Y, Oskarsson A, Knight CH, Tallkvist J. ABC- and SLC-Transporters in murine and bovine mammary epithelium - effects of prochloraz. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151904.
- Yin J, Sheng B, Qiu Y, Yang K, Xiao W, Yang H. Role of AhR in positive regulation of cell proliferation and survival. *Cell Prolif*. 2016;49(5):554-60.
- Zhou S, Zong Y, Ney PA, Nair G, Stewart CF, Sorrentino BP. Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. *Blood*. 2005;105(6):2571-6.

Literaturverzeichnis

Zidan N. Evaluation of the reproductive toxicity of chlorpyrifos methyl, diazinon and profenofos pesticides in male rats. Int J Pharmacol. 2009;5(1):51-7.

9 Anhang

Tabelle A 1 Übersicht über die Anzahl der Milchproben, die in den letzten 5 Jahren (2012 – 2016) im Nationalen Rückstandskontrollplan (NRKP) auf die ausgewählten Pestizide untersucht wurden

	Anzahl der untersuchten Milchproben (Überschreitung der MRL-Werte)				
	2012 ^a	2013 ^b	2014 ^c	2015 ^d	2016 ^e
Anzahl der Milchproben, die auf nachfolgendes Pestizid untersucht wurden					
Chlorpyrifos	11 (0)	11 (0)	11 (0)	10 (0)	17 (0)
Chlorpyrifos-methyl	7 (0)	7 (0)	7 (0)	6 (0)	17 (0)
Diiflufenican	n. g.	0	0	0	0
Dimethoat	0	0	0	0	0
Dimethomorph		0	0	0	0
Glyphosat	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.
Ioxynil	n. g.	0	0	0	0
Iprodion	0	0	0	0	0
Methiocarb	0	0	0	0	0
Prochloraz	0	0	0	0	0
Rimsulfuron	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.
Tebuconazol	0	0	0	7 (0)	0
Thiacloprid	1 (0)	1 (0)	2 (0)	0	7 (0)
Tolclofos-methyl	n. g.	0	0	0	0
Gesamtanzahl aller untersuchten Milchproben	1902	1933	2019	2010	2110

17 (0): 17 Milchproben auf dieses Pestizid untersucht, 0 Proben wiesen eine Überschreitung der gesetzlich festgelegten MRL-Werte auf, n. g.: nicht gelistet, keine Probe wurde auf dieses Pestizid untersucht, 0: keine Proben auf dieses Pestizid getestet

^a (BVL 2013c), ^b (BVL 2015b), ^c (BVL 2015d), ^d (BVL 2018b), ^e (BVL 2018c)

Anhang

Tabelle A 2 Übersicht über die Anzahl der Proben von Milch und Milchprodukten, die in den letzten 5 Jahren (2012 – 2016) im Warenkorb-Monitoring auf die ausgewählten Pestizide untersucht wurden

	Anzahl der untersuchten Proben														
	Butter (Vollfett)			Milch			Goudakäse			Butter (Vollfett)			Kuhmilch 3,5 %		
	2012 ^a			2013 ^b			2014 ^c			2015 ^d			2016 ^e		
untersuchtes Pestizid	N	NN	NB	N	NN	NB	N	NN	NB	N	NN	NB	N	NN	NB
Chlorpyrifos	80	55	25	114	86	28	n. g.			75	59	16	91	61	30
Chlorpyrifos-methyl	80	55	25	114	86	28	n. g.			75	59	16	91	61	30
Diifluenican	n. g.			n. g.			n. g.			n. g.			11	11	
Dimethoat	n. g.			28	28		12	12		22	22		31	31	
Dimethomorph	n. g.			n. g.			n. g.			n. g.			11	11	
Glyphosat	n. g.			n. g.			n. g.			n. g.			n. g.		
Ioxynil	n. g.			n. g.			n. g.			n. g.			11	11	
Iprodion	14	14		22	22		n. g.			10	10		16	16	
Methiocarb	n. g.			28	28		12	12		12	12		26	26	
Prochloraz	n. g.			28	28		19	12	7	28	22	6	70	68	2
Rimsulfuron	n. g.			n. g.			n. g.			n. g.			n. g.		
Tebuconazol	n. g.			28	28		19	12	7	77	71	6	97	82	15
Thiacloprid	n. g.			28	28		19	12	7	28	22	6	81	79	2
Tolclofos-methyl	n. g.			n. g.			n. g.			10	10		16	16	

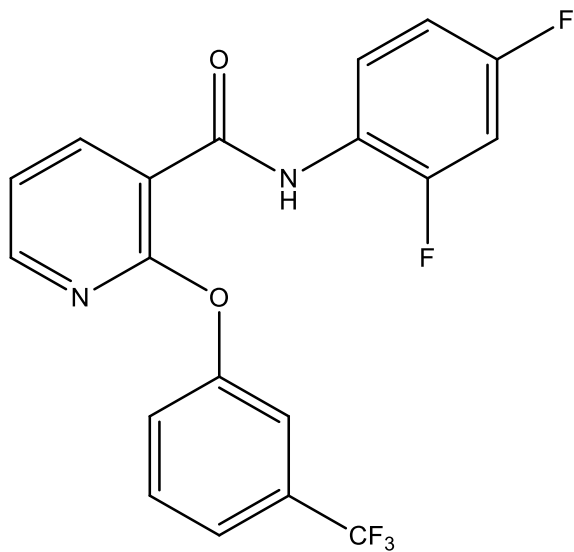
n. g.: nicht gelistet, keine Probe wurde auf dieses Pestizid untersucht, N: Gesamtanzahl der Proben, die auf dieses Pestizid untersucht wurden, NN: Anzahl der Proben, die mit der angewandten Analyseverfahren nicht nachweisbar waren, NB: Anzahl der Proben, die zwar nachweisbar aber nicht quantifizierbar waren

^a (BVL 2014b), ^b (BVL 2015c), ^c (BVL 2016d), ^d (BVL 2016e), ^e (BVL 2017c)

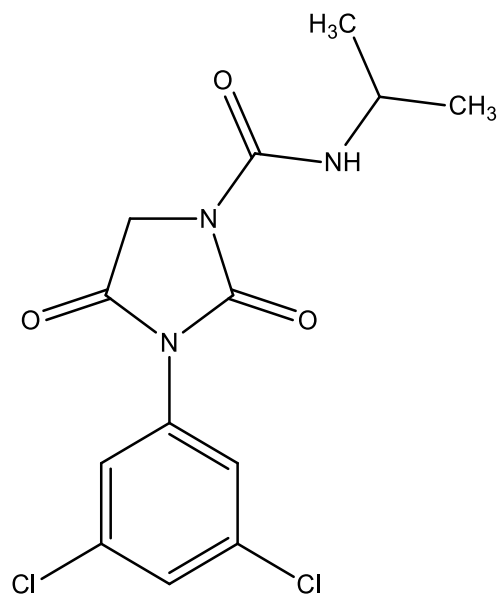
Tabelle A 3 Übersicht über Verteilungskoeffizienten der ausgewählten Pestizide (KIM et al. 2016)

ausgewähltes Pestizid	Summenformel	Log P
Chlorpyrifos	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	5,3
Chlorpyrifos-methyl	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	4,3
Diflufenican	$C_{19}H_{11}F_5N_2O_2$	4,6
Dimethoat	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	0,8
Dimethomorph	$C_{21}H_{22}ClNO_4$	3,9
Glyphosat	$C_3H_8NO_5P$	– 4,6
Ioxynil	$C_7H_3I_2NO$	2,0
Iprodion	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	3,1
Methiocarb	$C_{12}H_{15}NO_2S$	2,9
Prochloraz	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$	4,6
Rimsulfuron	$C_{14}H_{17}N_5O_7S_2$	0,7
Tebuconazol	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	3,7
Thiacloprid	$C_{10}H_9ClN_4S$	2,2
Tolclofos-methyl	$C_9H_{11}Cl_2O_3PS$	4,7

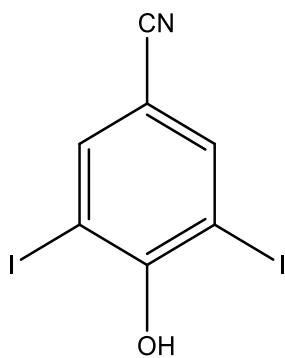
Log P: Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient



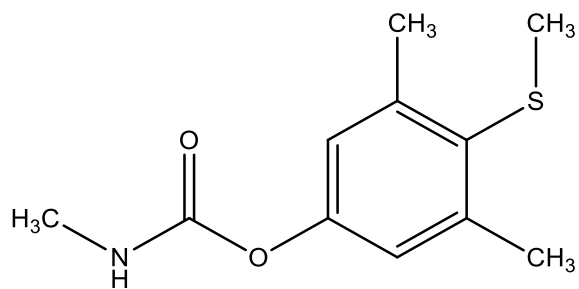
Diflufenican



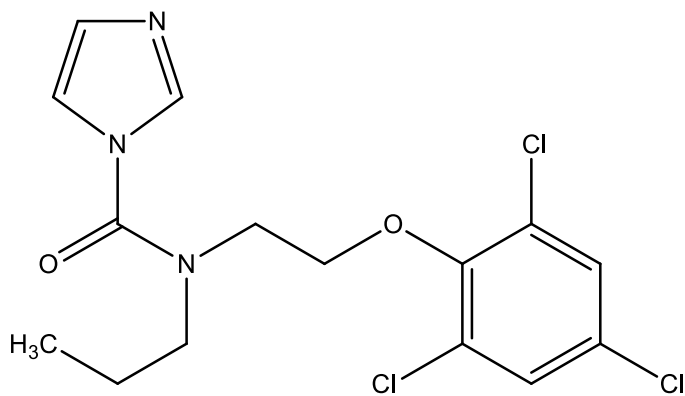
Iprodion



Ioxynil

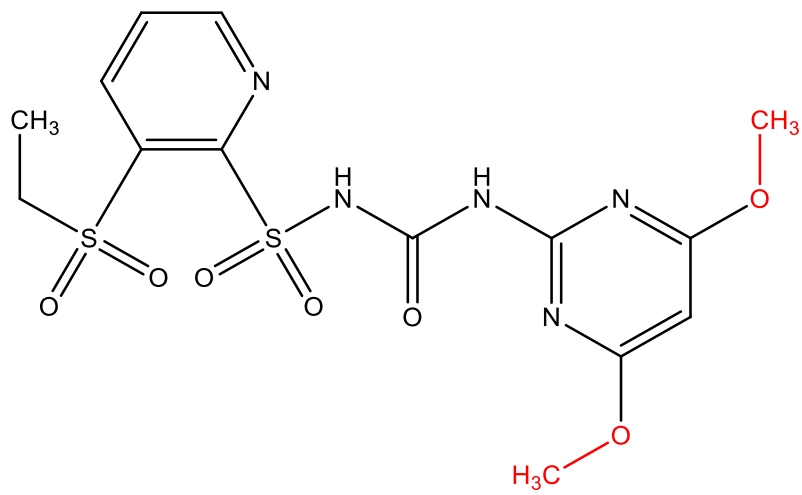


Methiocarb

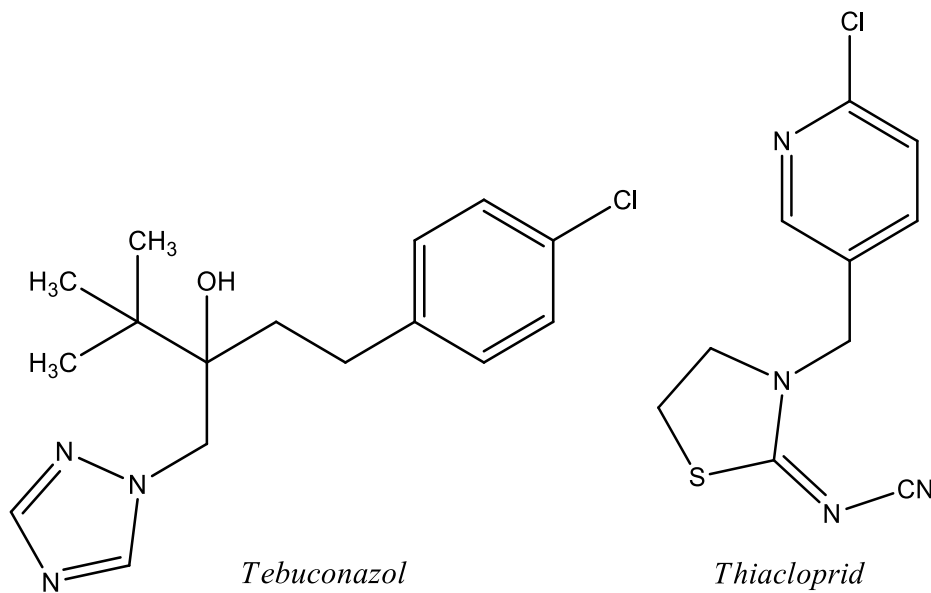


Prochloraz

Abb. A 1 Strukturformeln von Diflufenican, Iprodion, Ioxynil, Methiocarb und Prochloraz.



Rimsulfuron



Tebuconazol

Thiacloprid

Abb. A 2 Strukturformeln von Rimsulfuron, Tebuconazol und Thiacloprid.

10 Danksagung

Ich danke der H. Wilhelm Schaumann Stiftung für die Gewährung des Promotionsstipendiums und der SET-Stiftung für die Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Honscha danke ich für die Betreuung des anspruchsvollen Dissertationsthemas, aber vor allem für die Unterstützung, das Vertrauen in meine Arbeit und die Kompromissbereitschaft, die mir die Vereinbarkeit von Familie und Beruf ermöglicht. Weiterhin danke ich Frau Dr. Sandra Halwachs für die Projektbetreuung und den wissenschaftlichen Austausch.

Großer Dank geht an Cathleen und Birte für die Einarbeitung in die Zellkultur und die Methoden, aber vor allem für die großartige Unterstützung in und nach der Schwangerschaft. Und dafür, dass ihr es mit mir und meinen tausenden Ideen aushaltet. Liebe Cathleen, ich danke dir besonders für die Empathie, die vielen aufmunternden Worte und für deinen „guten Laborgeist“ [Zitat: Louise Wassermann].

Ich danke Hanna, für die schöne Zeit in der Zellkultur und an unseren vielen verschiedenen Arbeitsplätzen. Außerdem danke ich Michelle, die immer wieder für neue Impulse, Lacher und Spaß bei der Arbeit sorgt. Schön, dass es dich von Berlin nach Leipzig gezogen hat.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern im Institut für Pharmakologie und von VETIDATA für die herzliche Aufnahme und die stetige gegenseitige Unterstützung. Allen voran, Annett Hoffmann, die sich mit mir durch die vielen Sonderfälle meiner Anträge und Abrechnungen mühte, und auch Uwe Seibt, der etliche Laborrechner vor dem Windows10 Update Chaos bewahrte. Hierbei möchte ich mich besonders bei Ilka Emmerich bedanken, die meine vielen Fragen stets geduldig beantwortet.

Meinen Eltern, danke ich für die fortwährende Unterstützung in Sport, Schule, Studium und bei der Betreuung ihrer sechsten Enkelin. Dazu möchte ich meinen Schwiegereltern, Conny und Norman, danken, die unermüdlich durch Oma-Opa-Freitage Zeitfenster zum Schreiben geschaffen haben.

Danksagung

Mein größter Dank gebührt jedoch meinem Mann Robert für die jahrelange Begleitung durch Studium und Promotion, die vielen Anregungen, die motivierenden Worte, den wissenschaftlichen (v. a. chemischen) Austausch und für die gelungene Teamarbeit bei der Betreuung unserer gemeinsamen Tochter. Danke dafür, dass wir es uns getraut haben, akademische Laufbahn und Familie zu vereinbaren und diesen Weg GEMEINSAM zu gehen.

Unserer Tochter Klara möchte ich dafür danken, dass sie mir immer wieder vor Augen hält, dass „Wichtig“ relativ und unser Leben wertvoll ist.